

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

**Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones
peptídicas de hidrolizados proteínicos obtenidos a partir
de semillas de *Erythrina edulis***

TESIS

**Para optar al título profesional de Licenciado en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos**

AUTOR

Adrian Arturo Intiquilla Quispe

ASESORA

Karim Lizeth Jiménez Aliaga

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de semillas de *Erythrina edulis*”

Que presenta el Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

ADRIAN ARTURO INTIQUILLA QUISPE

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación ha obtenido la siguiente calificación:

Dieinueve (19), Con Mención

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller y Título Profesional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 30 de noviembre del 2015


Dra. AMPARO IRIS ZAVALA PESANTES
Presidente


Mgtr. ELIZABETH CHÁVEZ HIDALGO
Miembro


Blgo. OSCAR ACOSTA CONCHUCOS
Miembro


Lic. JUANA MARGARITA FLORES LUNA
Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú
Telfs.: (511) 328-4737 / 328-4739 Fax: (511) 619-7000 anexo 4819 Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification
N° BR233265



DEDICATORIA

A mis amados padres, Teófila y Sergio, por su inmenso amor y apoyo incondicional en todo momento, porque mis logros serán también siempre sus logros.

A mi querida esposa, Victoria, por su amor y comprensión durante todos estos años.

A mi adorada hija, María Fernanda, por ser mi inspiración y motivo de superación día a día.

A mis hermanos, Luis, Miguel y Giovanni, por sus consejos y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, Alma Mater de mi profesión y a la Escuela Académico Profesional de **Ciencia de los Alimentos**, que siempre nos orienta a ser buenos profesionales en la ciencia alimentaria.

A mi asesora de tesis, **Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga**, por su valiosa asesoría, amistad, apoyo y confianza depositada en mi persona en todo momento, que hoy la considero como la hermana mayor que nunca tuve.

A la **Dra. Amparo Zavaleta Pesantes**, por su generosidad, por motivarnos a seguir investigando con pasión y por darme la oportunidad de ingresar al Laboratorio de Biología Molecular.

A la, **Mg. Inés Arnao Salas**, por su amistad, confianza y ayuda científica en etapas muy importantes en el desarrollo de la tesis, considerándola como una segunda madre lo que me motiva a seguir creciendo.

Al equipo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular (en especial a la Mg. Carmen Peña, Mg. Elizabeth Chávez, Dr. Carlos Vegas, Salomón Sueros, Arturo Paredes, Nathali, Marco y Elvis), por su amistad y el apoyo brindado para el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de la promoción ingresante 2010 de la EAP: Ciencia de los Alimentos, por su amistad incondicional, sus consejos y buenos deseos.

A los docentes miembros del Jurado Examinador y Calificador, por sus importantes sugerencias para la mejor redacción final de la tesis.

A todas las personas que de una u otra manera me mostraron su apoyo y entusiasmo en el desarrollo de esta tesis.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Este trabajo fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad Innóvate Perú, Contrato 186-FINCyT-IA-2013 y parcialmente por el Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM (Código N° 150403027).

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
ÍNDICE GENERAL	6
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes	16
2.2. Pajuro (<i>Erythrina edulis</i>)	21
2.2.1. Taxonomía	23
2.2.2. Descripción Botánica	24
2.2.3. Distribución	26
2.2.4. Valor nutricional	28
2.2.5. Proteína de pajuro como fuente de péptidos bioactivos	29
2.3. Péptidos bioactivos	30
2.3.1. Actividades biológicas de péptidos bioactivos	31
2.3.1.1. Actividad antihipertensiva	31
2.3.1.2. Actividad antimicrobiana	32
2.3.1.3. Actividad inmunomoduladora	33
2.3.1.4. Actividad anticancerígena	34
2.3.1.5. Actividad antioxidante	35
2.3.2. Péptidos bioactivos en alimentos	38
2.3.3. Obtención de péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática	41
2.3.3.1. Enzimas proteolíticas	43
2.3.3. Tendencia de los péptidos bioactivos	46
2.3.4. Ensayos químicos para demostrar la Actividad Antioxidante	48

2.3.4.1 ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico)	49
2.3.4.2. DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	49
2.3.4.3. ORAC (Capacidad de absorción de radicales oxígeno)	50
III. MATERIALES Y MÉTODO	51
3.1. Obtención de la harina de pajuro	52
3.2. Análisis proximal de la harina	53
3.3. Obtención de concentrado proteico	53
3.4. Hidrólisis enzimática del concentrado proteico.	55
3.5. Determinación del grado de hidrólisis	57
3.6. Electroforesis SDS-PAGE.	60
3.7. Obtención de fracciones peptídicas.	62
3.8. Evaluación de actividad antioxidante	65
3.8.1. Ensayo de captación de radical ABTS+	65
3.8.2. Ensayo Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).	66
3.3.9. Análisis Estadístico de los resultados	69
IV. RESULTADOS	70
V. DISCUSIÓN	85
VI. CONCLUSIONES	92
VII. RECOMENDACIONES	94
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
IX. ANEXOS	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH:** Radical generador de radical peroxilo (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride).
- ABTS:** Radical estable de color azul-violeta (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico).
- APS:** Persulfato de amonio
- CP:** Concentrado proteico de pajuro
- DPPH:** Molécula radical estable de color púrpura (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)
- ECA:** Enzima convertidora de angiotensina
- EROS:** Especies reactivas de oxígeno
- ET:** Equivalente al Trolox.
- F1:** Fracción ultrafiltrada mayor a 10 kDa
- F2:** Fracción ultrafiltrada entre 3 y 10 kDa.
- F3:** Fracción ultrafiltrada menor a 3 kDa.
- FL:** Fluoresceína.
- GH:** Grado de hidrólisis
- HP:** Hidrolizado proteico de pajuro
- IC₅₀:** Concentración de la fracción peptídica que inhibe 50% del radical ABTS+.
- kDa:** KiloDaltones
- OPA:** Ortoftaldialdehído
- ORAC:** Capacidad de absorción de radicales oxígeno
- pH:** Potencial de hidrogeno
- ROO·:** Radical peroxilo.
- TEAC:** Capacidad antioxidante equivalente al Trolox.
- TEMED:** Tetrametiletilendiamina
- VCEAC:** Capacidad antioxidante equivalente a la Vitamina "C"

LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Clasificación taxonómica del Pajuro	10
Tabla 2. Composición química de la semilla de pajuro	15
Tabla 3. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo	17
Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de péptidos con actividad antioxidante	24
Tabla 5. Péptidos biológicamente activos derivados de proteínas alimentarias	26
Tabla 6. Productos con péptidos bioactivos disponibles en el mercado	27
Tabla 7. Proteasas comerciales de grado alimentario	30
Tabla 8. Preparación de curva de L-Serina	46
Tabla 9. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE	49
Tabla 10. Análisis proximal de la harina de pajuro	58
Tabla 11. Determinación de la actividad antioxidante TEAC-ABTS	65
Tabla 12. Determinación de la actividad antioxidante VCEAC-ABTS	66
Tabla 13. Determinación de la actividad antioxidante ORAC.	70
Tabla 14. Cuadro resumen de la actividad antioxidante de las muestras.	72

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Vaina y semilla de pajuro	8
Figura 2. Árbol de pajuro	12
Figura 3. Distribución de pajuro en América Latina	13
Figura 4. Árbol de pajuro utilizado como cerco de cultivo.	14
Figura 5. Reacciones catalizadoras de la ECA	18
Figura 6. Mecanismo de acción con actividad microbiana	20
Figura 7. Inducción de apoptosis celular: vía intrínseca y extrínseca	21
Figura 8. Generación de estrés oxidativo	22
Figura 9. Mecanismo catalítico de una proteasa	29
Figura 10. Teoría de Linderstrøm-Lang para hidrólisis de proteína globulares	29
Figura 11. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica	32
Figura 12. Cambio del papel de los alimentos según su actividad	33
Figura 13. Productos alimenticios y de higiene bucal con péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante y anticariogénicos.	34
Figura 14. Radical ABTS+	36
Figura 15. Radical DPPH	37
Figura 16. Reactivo de Fluoresceína	37
Figura 17. Metodología experimental	39
Figura 18. Recolección de las semillas de pajuro	40
Figura 19. Extracción de proteínas en medio alcalino	42
Figura 20. Mecanismo de acción de la hidrólisis	44
Figura 21. Separación de proteínas por tamaño molecular	50
Figura 22. Tubos para ultrafiltración Macrosep Advance Centrifugal Devices	51

Figura 23. Procedimiento de ultrafiltración del hidrolizado proteico de pajuro	52
Figura 24. Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante	53
Figura 25. Reacciones que tienen lugar en la determinación del ORAC	55
Figura 26. Distribución de las muestras en microplaca para determinar ORAC	56
Figura 27. Patrón electroforético (SDS-PAGE) del Concentrado Proteico (CP)	59
Figura 28. Determinación de la concentración de proteína durante la hidrolisis	60
Figura 29. Patrón electroforético (SDS-PAGE) del Hidrolizado Proteico (HP)	60
Figura 30. Curva % Grado de Hidrólisis con Alcalasa	61
Figura 31. Fracciones peptídicas obtenidas luego de la ultrafiltración	62
Figura 32. Porcentaje de Inhibición del radical ABTS+	63
Figura 33. Determinación de los valores TEAC-ABTS	64
Figura 34. Actividad antioxidante TEAC de CP, HP y las fracciones F1, F2 y F3.	65
Figura 35. Actividad antioxidante VEAC-ABTS CP, HP y las fracciones F1, F2 y F3.	66
Figura 36. Curvas: % inhibición vs concentración de muestra.	67
Figura 37. Representación gráfica para la obtención de los valores IC ₅₀	68
Figura 38. Actividad antioxidante mediante ORAC: CP, HP y las fracciones F1, F2 y F3.	69
Figura 39. Curvas: AUC Neto vs concentración de muestra	67
Figura 40. Actividad antioxidante ORAC de CP, HP y las fracciones F1, F2 y F3	71

RESUMEN

Existen numerosos estudios que relacionan al estrés oxidativo con diferentes enfermedades crónico-degenerativas y en ese sentido, en la actualidad se busca nuevos compuestos antioxidantes que ayuden a contrarrestar sus efectos negativos. En los últimos años se vienen reportando péptidos bioactivos provenientes de hidrolizados de proteínas de leguminosas con un buen perfil antioxidante. Una leguminosa poco conocida con un buen contenido de proteínas (18 a 25%), es pajuro (*Erythrina edulis*), las cuales son fuentes potenciales para la obtención de biopéptidos. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas del hidrolizado proteico de pajuro. Inicialmente se aisló un concentrado proteico de pajuro según lo propuesto por Betancur y col, el cual fue hidrolizado por 2 horas, con Alcalasa 2,4 L una enzima comercial de grado alimentario, alcanzando un Grado de Hidrólisis (GH) de 44.60%. Este hidrolizado fue fraccionado por ultrafiltración obteniendo tres fracciones peptídicas de tamaños: mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa, de estas fracciones se evaluó su actividad antioxidante *in vitro* por los métodos TEAC-ABTS y ORAC. Por ambos métodos la mayor actividad antioxidante fue para la fracción < 3 kDa, con $636.20 \pm 4.27 \mu\text{mol ET/g}$, un IC_{50} de $23.14 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$ en TEAC-ABTS y de $1.176 \pm 0.074 \mu\text{mol ET/mg}$ para el ORAC. En conclusión, las fracciones peptídicas del hidrolizado proteico de pajuro presentan actividad antioxidante y serían una buena fuente para la obtención de péptidos bioactivos.

Palabras clave: *Erythrina edulis*, fracciones peptídicas, TEAC-ABTS, ORAC, Alcalasa.

ABSTRACT

There are great numbers of studies that associate oxidative stress with different chronic degenerative diseases. Therefore, nowadays new antioxidant compounds that help counteract the negative effects sought are being studied. In the last years, have been reported bioactive peptides from protein hydrolysates legumes with a good antioxidant profile. A unknown legume with a high protein content (18-25%) is the pajuro, which could be an important source for obtaining these biopeptides. For this reason, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of the peptide fractions obtained from pajuro protein hydrolyzate (*Erythrina edulis*). Initially, pajuro protein concentrate was isolated in agreement with a method reported by Betancur et al, which was hydrolyzed with a commercial food grade enzyme, Alcalase 2.4 L, for a period of 2 hours, reaching a degree of hydrolysis (GH) of 44.60%. The hydrolyzate was fractionated by ultrafiltration, obtaining three sizes of peptide fractions: > 10 kDa, 3 - 10 kDa and < 3 kDa. The in vitro antioxidant activity of this fractions was evaluated by TEAC-ABTS and ORAC methods in the three size of peptide fractions. For both methods the highest antioxidant activity was for the <3 kDa fraction, whose results were $636.20 \pm 4.27 \mu\text{mol ET/g}$, a IC_{50} of $23.14 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$ for TEAC-ABTS and $1.176 \pm 0.074 \mu\text{mol ET/mg}$ for ORAC. In conclusion, the peptide fractions obtained from pajuro protein hydrolyzate present antioxidant activity and could be very important to obtain bioactive peptides.

Keywords: *Erythrina edulis*, peptide fractions, TEAC-ABTS, ORAC, Alcalase

I. INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con una gran biodiversidad de productos naturales, uno de estos es el pajuro (*Erythrina edulis*), una leguminosa que contiene entre 18 a 25% de proteínas, el pajuro se cultiva en los valles interandinos bañados principalmente por los ríos Vilcanota, Huallaga, Marañón, Condebamba, Huancabamba y en las entradas de algunos valles costeros, sobre todo en los de la región norte de nuestro país (1).

En la actualidad, las proteínas alimentarias procedentes de vegetales se investigan no solo del punto de vista nutricional sino como insumos para la obtención de péptidos funcionales o bioactivos, los cuales se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen diversas actividades biológicas, después de su liberación por hidrólisis enzimática o química. La administración oral de los péptidos bioactivos puede ejercer su efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico, y nervioso (2) (3).

En los últimos años se vienen reportando péptidos bioactivos provenientes de hidrolizados de proteínas de leguminosas con un buen perfil antioxidante (4) (5). Se han descrito péptidos antioxidantes en hidrolizados obtenidos a partir de semillas de pallar (*Phaseolus lunatus*), Chía (*Salvia hispanica* L), frijol castilla (*Vigna unguiculata*), entre otras (6)(7)(8).

Así mismo, varios estudios reportan la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos y péptidos aislados, principalmente de proteínas de origen animal como la leche, huevo y pescado (9). En ese sentido, los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas pueden emplearse como ingredientes funcionales en sistemas alimentarios para reducir los cambios oxidativos durante el almacenamiento.

Por ello, la presente investigación se centró en la búsqueda de péptidos antioxidantes en las fracciones peptídicas de los hidrolizados proteicos obtenidos de las semillas de pajuro.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas obtenidas a partir del hidrolizado proteico de las semillas de pajuro (*Erythrina edulis*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las proteínas solubles a partir de la harina de las semillas de *Erythrina edulis*.
2. Hidrolizar enzimáticamente el concentrado proteico utilizando diferentes proteasas comerciales.
3. Obtener las fracciones peptídicas por ultrafiltración en base a su tamaño molecular.
4. Evaluar la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas mediante los métodos ABTS Y ORAC.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes.

En los últimos años se está estudiando mucho la obtención de péptidos de bajo peso molecular de distintas fuentes alimentarias, a los cuales se les ha atribuido distintas actividades biológicas, entre ellas la actividad antioxidante.

Los péptidos con actividad biológica, han sido aislados principalmente de hidrolizados proteínicos como leguminosas y de productos lácteos modificados por fermentación bacteriana, pero también se pueden generar durante la digestión gastrointestinal(10).En breve a continuación se presentan trabajos relacionados a la obtención de péptidos bioactivos.

Medrano y col (2011) (11) obtuvieron péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis enzimática de glicinina de soya con la proteasa de *Streptomyces-griseus* (PSG) y Flavourzyme, Los hidrolizados con Flavourzyme presentaron mayor capacidad antioxidante al actuar frente a los radicales ABTS (260 μ moles TE/g que con PSG (180 μ moles TE/g) luego de 4 horas de hidrólisis. Hubo una correlación directa entre %GH de Flavourzyme y su acción frente a radicales ABTS.

Ajibola y col (2011) (12), realizaron una hidrólisis enzimática de un aislado de proteína de frijol ñame africano por tratamiento con Alcalasa. Seguidamente, el hidrolizado se fraccionó en tamaños de péptidos de <1, 1-3, 3-5 y 5-10 kDa mediante ultrafiltración. El GSH, fue usado como control y tuvo la mayor actividad de captación de DPPH (42,29%) en comparación con los de APH (hidrolizados proteicos) y sus fracciones de membrana. Así mismo no hubo significativa diferencia ($p > 0,05$) entre las fracciones de 1 kDa y <3kDa.

Contreras y col (2011) (13) hidrolizaron la proteína de suero de leche enriquecida con B-lactoglobulina usando corolase PP y Termolisina y evaluaron la actividad antioxidante por el método ORAC, obteniendo 2.57 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ proteína para la hidrólisis realizada por 8 horas con termolisina. También fueron identificados por RP-HPLC-MS / MS 19 secuencias peptídicas, siendo las de mayor interés: LQKW f(58-61) y LDTDYKK f(95-101).

Valdez-Ortiz y col (2012) (14) trabajando con los concentrados proteicos de *Sulphur yellow* digeridos con Alcalasa, Termolisina y Pancreatina encuentran que los péptidos obtenidos mostraron una buena capacidad antioxidante, siendo la mejor con el tratamiento con Alcalasa teniendo un valor de hasta 99,89% de capacidad de captación del radical ABTS⁺. Llegando a concluir que los hidrolizados proteicos de frejol azufrado son adecuados para el desarrollo de un producto nutracéutico.

Karaş y col (2014) (15) obtuvo hidrolizados proteicos con pepsina a partir de *Phaseolus vulgaris* crudos y tratados térmicamente donde estos últimos mostraron la mayor capacidad para secuestrar DPPH • (46,12%) y ABTS + • (92,32%) que los crudos (38,02% y 88,24% respectivamente). Los valores de IC50 para la capacidad quelante Fe²⁺ fueron de 0,81 y 0,19 mg · ml⁻¹, para ambos tratamientos,

Folmer y col (2014) (16) en su estudio con suero de queso de oveja, realizó una hidrólisis con proteasas de *Bacillus sp*, encontrando hidrolizados con actividad antioxidante que aumentó 3,2 veces a las 6 horas de hidrólisis (51,3%). La máxima quelación de Fe²⁺ se logró a las 3 horas. Se identificó a partir de las 4 horas de hidrólisis la secuencia peptídica LAFNPTQLEGQCHV, derivada de lactoglobulina.

Mokni y col (2015) (17), hidrolizó un concentrado proteico de garbanzo con Alcalasa, el cual fraccionó mediante cromatografía de exclusión con Sephadex G-25 en cuatro fracciones principales (Fra.I, Fra.II, Fra.III, y Fra.IV). La Fracción III, que exhibió el valor más alto de inhibición de DPPH (54% a 1 mg / ml), se fraccionó por cromatografía RP-HPLC, resultando once fracciones de las cuales dos sub fracciones peptídicas mostraron mayor actividad antioxidante P3 y P8. Esta última a una concentración de 200 µg/mL, mostró la más alta inhibición frente a DPPH con un 67%.

Torres-Fuentes y col 2015 (18) caracterizaron péptidos con actividad antioxidante procedentes de hidrolizados proteicos de garbanzo tratados con pepsina y pancreatina. Las secuencias peptídicas fueron identificados por RP-HPLC–MS/MS resultando las siguientes secuencias: ALEPDHR, TETWNPNHPEL, FVPH y SAEHGSLH, que correspondió a legumina, la principal proteína de la semilla. La mayoría de los péptidos contenían histidina, aminoácido que ha demostrado actividad antioxidante.

Liu y col 2015 (19) purificaron e identificaron péptidos antioxidantes a partir del hidrolizado proteico de huevo blanco, resultando obtener tres nuevos péptidos con pesos moleculares de 628,64 Da, 630,71 Da, y 684,10 que fueron identificados por LC–MS/MS, como DHTKE, FFGFN y MPDAHL, respectivamente. La concentración de FFGFN y MPDAHL para secuestrar el 50% de los radicales DPPH fue 80 mM y 60 mM, respectivamente.

Yan y col 2015 (20) usaron múltiples proteasas para optimizar la hidrólisis de la proteína de residuos de arroz (RRP) y producir nuevos antioxidantes, una fracción peptídica (RRPB3) con CI50 de 0,25 mg / ml determinada por el método DPPH,

mediante ultrafiltración de membrana seguido por cromatografía de exclusión de tamaño y de fase inversa.

García-Mora y col 2015 (21) obtuvo péptidos bioactivos a partir de (*Phaseolus vulgaris*) de variedad pinto, hidrolizando con alcalasa y savinasa obteniendo a los 120 minutos, una actividad antioxidante de 326 y 348 mmol TE/g, respectivamente determinado por el método ORAC. La eficiencia proteolítica más alta fue para Alcalasa.

En base a los estudios realizados, podemos decir en definitiva que las leguminosas son una fuente potencial para obtener péptidos con diferentes actividades biológicas, entre ellas la actividad antioxidante, sin embargo aún no todas las leguminosas han sido aprovechadas, como es el caso de pajuro, un frejol de cultivo sub-utilizado, el cual resulta de mucho interés para la obtención de estos péptidos bioactivos.

2.2. PAJURO (*Erythrina edulis*)

El pajuro es una leguminosa de gran tamaño que pertenece al género *Erythrina*, de la cual se conoce que posee 112 especies, y específicamente *Erythrina edulis* es la única especie que produce semillas comestibles (Figura 1) y ésta suele crecer en gran parte de Latinoamérica, especialmente en regiones andinas de Colombia, Ecuador y Perú en altitudes de 900-3200 m.s.n.m. Este frejol fue cultivado y aprovechado por los Incas y las culturas regionales asentadas en distintas áreas de los Andes y tiene un gran valor nutricional. Sin embargo, con seguridad podemos decir que hoy en el Perú, el pajuro es una planta semi-cultivada, ya que crece de manera silvestre y en algunos casos el campesino solo se limita muy esporádicamente a plantar una estaca y dejarla que se desarrolle libremente sin ninguna atención (22).



Figura 1. Vaina y semillas de pajuro.

a) Origen e Historia.

El origen de la *Erythrina* en el mundo no es muy claro, debido a que no se ha encontrado ningún registro fósil del género. Mucha diversificación de *Erythrina* ha ocurrido independientemente en África y América y en menor grado en Asia, sin embargo América del Sur parece ser su lugar de origen (23). El género *Erythrina* comprende cerca de 112 especies distribuidas alrededor de las regiones tropicales y subtropicales del mundo y extendida en áreas de temperaturas calientes, como África, Himalaya, China Meridional, Sur de Estados Unidos, Centroamérica, el Caribe y América del Sur hasta el río de la Plata en Argentina (23).

Respecto a la antigüedad como alimento de las sociedades andinas, diversos investigadores, dan cuenta de su presencia en nuestro territorio. Una referencia gráfica antigua, posiblemente la primera que se tiene del pajuro, es la del obispo de Trujillo Baltasar Jaime Martínez de Compañón, quien nos presenta una hermosa lámina-acuarela con la denominación de poroto, pues lo conoció y seguramente lo degustó durante su visita pastoral realizada después de 1778 a la zona de Huamachuco, hoy día llamada provincia José Faustino Sánchez Carrión (1).

Así mismo en estudios realizados por investigadores peruanos contemporáneos sobre el pajuro son reducidos; la mayoría de ellos solo presentan breves descripciones y comentarios. Como ejemplo tenemos al doctor Antúnez de Mayolo, quien manifestó que entre las menestras cultivadas en el antiguo Perú se encuentra el pashuru o pajuro (*Erythrina edulis*) el cual fue uno de los alimentos primordiales en la alimentación en el Antiguo Perú (24).

2.2.1. Taxonomía.

El pajuro pertenece a la familia de las fabáceas (Tabla 1), a uno de los 112 géneros de *Erythrina*.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Pajuro.

División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Tribu:	<i>Phaseoleae</i>
Género:	<i>Erythrina</i>
Especie:	<i>Erythrina edulis</i>

2.2.1.1. Nombres comunes y etimología

a) Nombres comunes: Chachafruto, Balú, Nupo, Fríjol nopaz, Basul, Guimo, Habijuela, Sachafruto, Poruto, en **Colombia**. Guato, Porotón, Cañaro, Camporoto, Frijol de monte, Zapote de cerro, Pajuro en el **Ecuador**. Pisonay, Anteporoto, Pasugua, Sachaporoto, Pisonay, Pajul en **Perú**. Bucare, Mompás, Frijol Mompás en **Venezuela** (1).

b) Etimología: El nombre genérico *Erythrina* proviene del griego *Erythros* que significa rojo por el color predominante de la flor (Figura 2).

2.2.2. Descripción botánica.

Tamaño. Es un árbol frondoso de altura variable, tiene en promedio entre 10 a 15 metros, armados con aguijones pequeños y ramas pronunciadas (1).

Tallo. Su tronco es de regular grosor (1.20 m) y posee algunas espinas que parecen púas, por tales razones su reconocimiento es muy fácil (1).

Hojas: Presenta hojas coriáceas, envés de la hoja glabra; pinnadas con la vena principal o raquis pulverulento. Los folíolos son enteros generalmente con estipulas de formas ovales, elípticas, acuminadas en ápice, comúnmente miden de 10 a 20 cm de largo y de 5 a 15 cm de ancho, con pedicelo de 3 a 8 mm de largo (25).

Flores: Son algo pulverulentas, con pedúnculo floral que mide aproximadamente de 3 a 18 mm de largo. El cáliz es bilabiado, delgado, de aproximadamente 1cm de largo y de 8 a 10 mm de ancho. Las flores presentan un estandarte ancho y elíptico de 2 a 3 cm de largo con alas muy pequeñas, miden de 3 a 6 mm de largo y se encuentran ocultas en el cáliz. Todas las especies (menos una de la cual son verdes) son rojas o anaranjadas (25).

Fruto: Es una legumbre coriácea, ancha, oblonga lineal moderadamente comprimida entre la inmensa semilla tierna, la vaina toma un tamaño de 15 a 25 cm de longitud y por lo general contiene seis semillas en cada vaina, las cuales tienen un tamaño de 3 a 5 cm con estrías entre las semillas (25).



Figura 2. Árbol de pajuro. Tomado de García (2008) (29).

Así mismo en cuanto al aspecto ecológico de la especie, además de ser un árbol perenne y longevo (promedio de 140 años, según cálculos realizados por campesinos propietarios de pajuro), es un notable fijador de nitrógeno, no requiere cuidados ni tratamiento fitosanitario, controla la erosión del suelo, se adapta a terrenos áridos, soporta largos períodos de sequía, entre otras cualidades (1).

2.2.3. Distribución.

El género *Erythrina* cuenta con 112 especies de árboles, arbustos y algunas hierbas. *E. edulis* se encuentra en Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Argentina, Panamá, y Ecuador (Figura 3) (26).

Las regiones con mayor presencia de plantas y producción de pajuro se ubican al norte del país, en los departamentos de Huánuco, Ancash, La Libertad, Cajamarca, Piura y Amazonas, siendo los mercados de Huaraz, Trujillo, Otuzco, Huamachuco, Cajabamba, San Marcos, Cajamarca y Chachapoyas que venden pajuro regularmente en pequeñas cantidades (1).

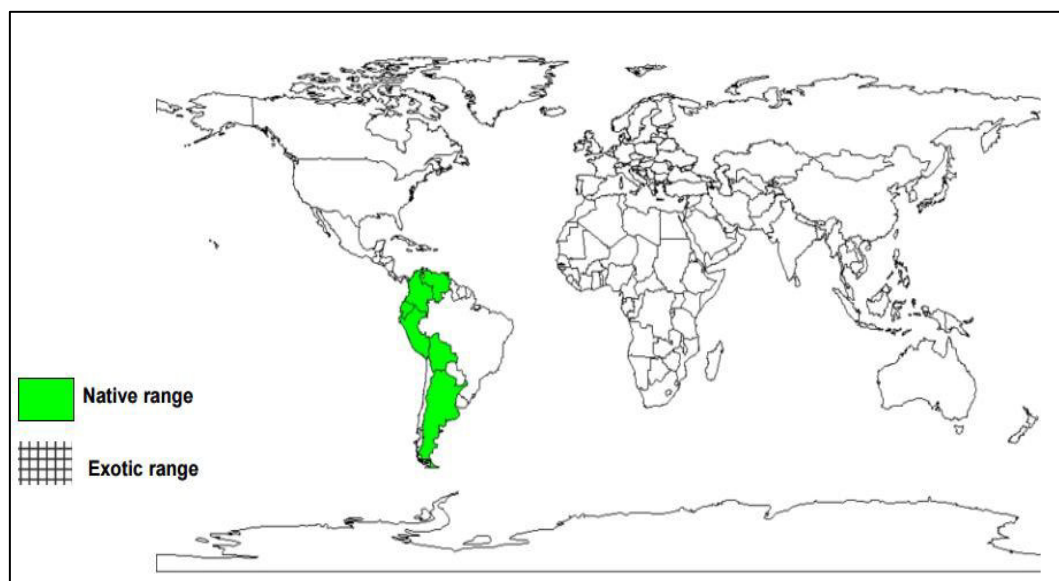


Figura 3. Distribución de pajuro en América latina. Tomado de Triana ex M. (2009) (25).

2.2.3.1. Propagación y cultivo.

Los pobladores andinos poseen diversas técnicas agrícolas que lo emplean desde tiempos antiguos. Para el caso de la propagación y cultivo del pajuro se emplean la siembra por semilla, colocando el dorso hacia arriba y el “omblico” hacia abajo. La siembra debe ser superficial quedando la semilla casi a la vista. La plantación debe hacerse al inicio de la temporada lluviosa si el terreno carece de riego. Así mismo la siembra con semilla fresca debe realizarse inmediatamente de ser colectada a fin de aprovechar la propia humedad de la semilla (27).

La siembra por estaca se realiza seleccionando cada estaca, las que deben tener de 45 a 50 cm de largo y que sean sobre todo de árboles jóvenes, En la siembra la estaca se debe enterrar unos 20 centímetros, plantándose a más tardar a los 4 días siguientes a su colección (27).

Así mismo se conoce que en nuestro país este frejol es cultivado por los pobladores de la zona solo para su consumo local, y en otros casos lo usan para cercar sus terrenos de cultivo (Figura 4), por su tamaño y apariencia, ya que esta no necesita muchos cuidados fitosanitarios (1).

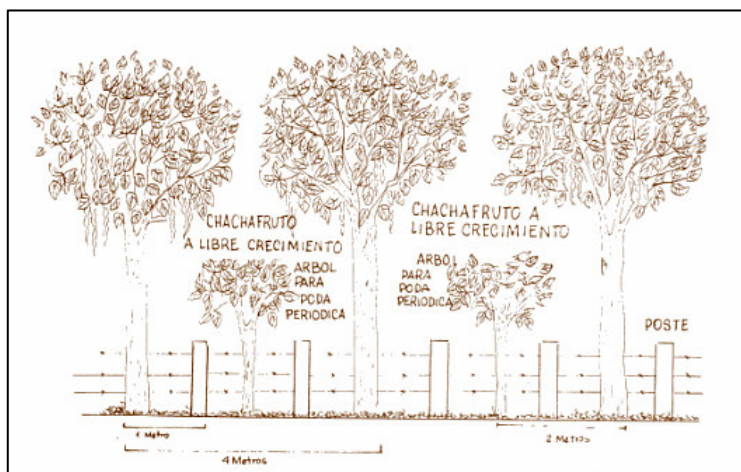


Figura 4. Árbol de pajuro utilizados como cerco de terrenos de cultivo. Tomado de Acero y col (2002) (27).

2.2.4. Valor nutricional.

El valor nutritivo de la semilla de pajuro es mejor que otros granos provenientes de leguminosas, por lo que es requerida en diferentes recetas alimenticias del consumo humano como: tortas, cremas, coladas, dulces, puré, sancochado etc. Algunos nutrientes que presenta son:

Tabla 2: Composición química de la semilla de pajuro fresca.

Compuesto	por 100 g de Semilla fresca
Calorías	120 kcal
Agua	64.4 g
Grasa	0.3 g
Carbohidratos	31.5 g
Fibra cruda	1.5 g
Cenizas	1.7 g
Calcio	25 mg
Fósforo	105 mg
Hierro	1.2 mg
Retinol	0.0 µg
Tiamina	0.05 mg
Rivoflavina	0.22 mg
Niacina	1.39 mg
Vitamina C	42.00 mg

Fuente: Tabla de composición de alimentos del Perú del INS 2009.

Respecto al contenido de proteínas esta es muy favorable, llegando a alcanzar hasta un 25%, así mismo el aporte de la calidad biológica de proteínas, procedentes del pajuro, es superior a la del frijol, lenteja, arvejas o garbanzo. El valor biológico de la proteína del pajuro es de 70.9% que, en comparación con otras legumbres como la lenteja 44%, la del frijol 58%, o la de la arveja 63.7%, es mucho mayor. Así mismo el porcentaje de eficiencia proteica (eficiencia de una proteína para que el peso ganado de un animal aumente por cada unidad de proteína dada en el alimento), es de 1.15 significativamente mayor al de frejol 0.88 y el de la lenteja 0.91 (27). Así mismo en el análisis de las fracciones proteicas, se precia una mayor presencia de glutelinas (13.29% de 18.24% de proteínas totales) (28).

El pajuro presenta un bajo contenido en grasa 0.3%, lo cual facilita su almacenamiento y conservación, asimismo respecto al contenido de minerales el de mayor presencia es el fósforo con 105 mg.

2.2.5. Proteína de *Erythrina edulis* como fuente de péptidos bioactivos

El potencial de *Erythrina edulis* es enorme combinado con cultivos agrícolas, es una especie que manejada adecuadamente puede brindar muchos beneficios, especialmente en la alimentación y como fuente para la obtención de alimentos funcionales, forraje para ganado, fijación del nitrógeno al suelo, controlador de erosión del suelo, aporte de materia orgánica al suelo por la caída de las hojas de fácil descomposición (29). En ese sentido en el presente trabajo de investigación se toma a un cultivo sub-utilizado como *Erythrina edulis* como materia prima para la obtención de péptidos con propiedades antioxidantes y su futura aplicación en la industria alimentaria y/o farmacéutica.

2.3. Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática (30). Son liberados durante el procesamiento industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal (31). Generalmente, son de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud (lunasina con 43 aminoácidos). La literatura científica nos indica que estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico (32). Entre las distintas actividades que pueden generar estos péptidos son los que se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 3. Péptidos biológicamente activos y sus efectos en el organismo.

Péptidos	Efecto en el organismo
Inmunomoduladora	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (antihipertensivo)	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y Envejecimiento
Resultados del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación intestinal	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolemicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades Cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

Fuente: Iwaniak & Minkiewicz, 2007. (33)

2.3. 1. Actividades biológicas de péptidos bioactivos

2.3.1.1. Actividad antihipertensiva.

La actividad antihipertensiva es la propiedad más estudiada de los péptidos, ya que existe un gran interés por determinar su eficiencia en disminuir los niveles de presión sanguínea, esto es debido a que en los países industrializados las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de la mortalidad. Los péptidos que poseen la actividad antihipertensiva inhiben a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que convierte la angiotensina I (decapéptido) a angiotensina II (octapéptido), un potente vasoconstrictor. Además la ECA también actúa en el sistema quinina-caliceína catalizando la degradación del nonapéptido vasodilatador bradiquinina (34). Los inhibidores de la ECA reducen la formación de la angiotensina II y la degradación de la bradiquinina, disminuyendo así la vasoconstricción de las arterias y produciendo por tanto un efecto hipotensor (Figura 5).

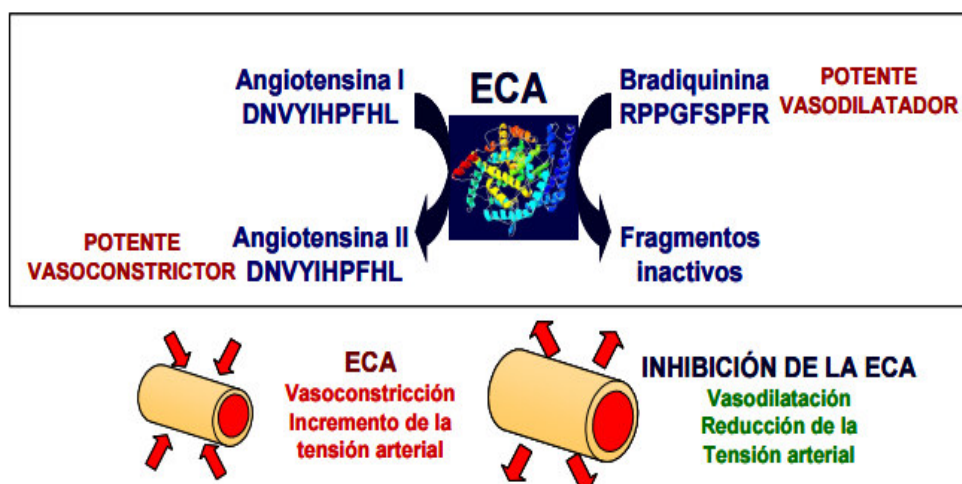


Figura 5. Reacciones catalizadoras de la ECA. Tomado de Quiroz del Bosque, 2007 (34).

Existen muchos estudios “*in vitro*” como “*in vivo*” sobre los péptidos antihipertensivos y se describe que su mecanismo de acción es similar a la de los fármacos, ya que los tres últimos residuos de aminoácidos adyacentes a la región del C-terminal se enlazan fuertemente al sitio activo de la ECA. La mayor inhibición la presentan los péptidos que contengan residuos de aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) (35).

En la actualidad, muchos inhibidores de la ECA han sido descubiertos a partir de hidrólisis catalizada enzimáticamente en proteínas procedentes de fuentes animales incluyendo caseína bovina, y proteínas de pescado, pero también a partir de fuentes vegetales como soya, pallar, frejol entre otros (35).

2.3.1.2. Actividad antimicrobiana

Numerosos péptidos con actividad antimicrobiana han sido aislados de productos lácteos, leguminosas, cereales, peces, anfibios y peces marinos. La actividad de los péptidos antimicrobianos es usualmente expresada por la desintegración de la membrana celular donde la doble capa lipídica de la célula es el principal objetivo. (36)

La mayoría de los péptidos antimicrobianos que contienen estructuras alfa helicoidales son catiónicos y anfipáticos. Las propiedades catiónicas de los péptidos permiten el enlace con los fosfolípidos aniónicos de la membrana, lo cual inicia la lisis celular (36). El mecanismo de los péptidos antimicrobianos se divide en tres etapas como se observa en la figura 6.

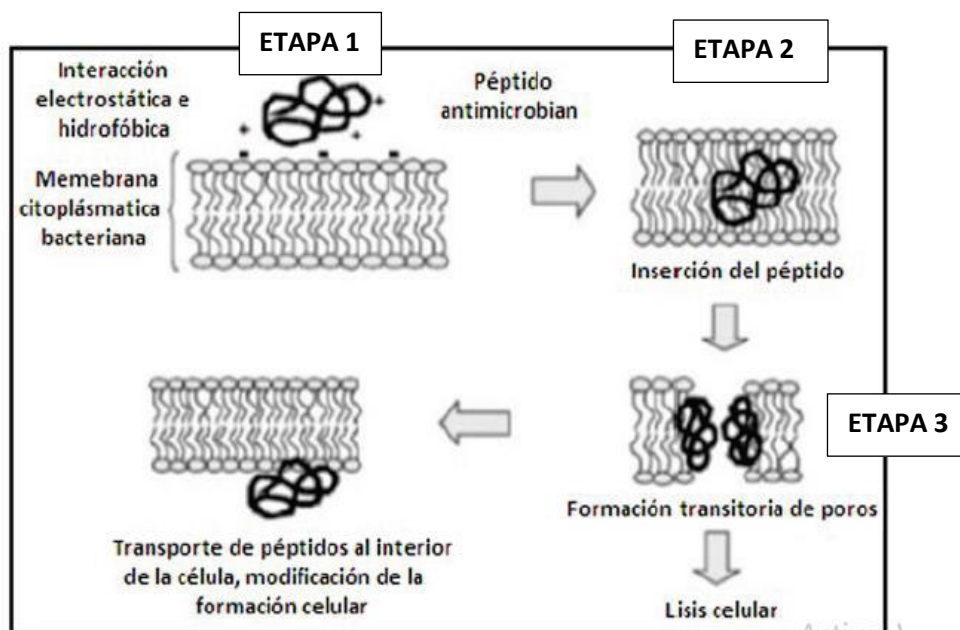


Figura 6. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.
Tomado de Kleinrt y col, 2003 (36).

Los péptidos antimicrobianos más estudiados hasta el momento son los encontrados en la leche y el huevo de las proteínas de la lactotransferrina y la ovotransferrina respectivamente. Éstos péptidos poseen actividad antibacteriana frente a gran variedad de microorganismos entre los que se incluyen *Staphylococcus* sp y *Streptococcus pyogenes* (37).

2.3.3. Actividad inmunomoduladora

Los péptidos bioactivos con propiedad inmunomoduladora más estudiados son también aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos. Suelen ser fragmentos derivados del alfa-s caseína, de la beta-caseína, kappa-caseína y alfa-lactoalbúmina. Se ha observado en pruebas *in vitro* que los péptidos obtenidos por hidrólisis del suero lácteo estimulan la proliferación de células del sistema inmune (38). Además, se han obtenido fragmentos de beta-lactoglobulina, hidrolizados enzimáticamente, que al ser probados en ratones mejoraron la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales (39).

2.3.1.4. Actividad anticancerígena

Los péptidos descritos con esta actividad, están relacionados con las citomoduladoras que inhiben el crecimiento de las células cancerígenas y estimulan la actividad de las células inmunocompetentes y en intestinos neonatales, respectivamente. Poseen inmunidad innata y a través de diversos mecanismos matan a la célula cancerosa. Los mecanismos son: Lisis de membrana, inducción de apoptosis, de expresiones génicas, de efectos sinérgicos con otros sistemas de defensa (40).

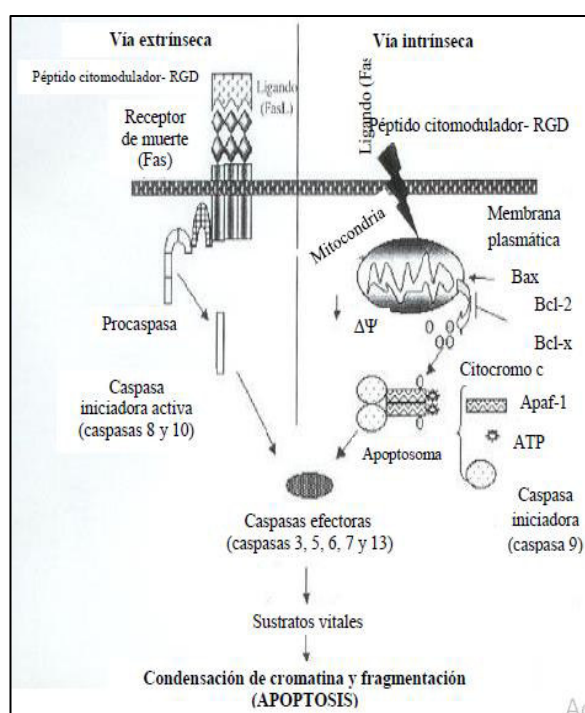


Figura 7. Inducción de apoptosis celular: vía intrínseca y extrínseca. Tomada de Preza y Lerma, 2010 (40).

Las proteínas de suero de leche han demostrado, en estudio con modelos animales *in vitro*, poseer actividad anticancerígena, su mecanismo está relacionado con un incremento de la síntesis de glutatión y la subsiguiente estimulación de la actividad inmune y antioxidante (40).

También se han descrito péptidos obtenidos de otras fuentes, como la soya, de donde se aisló un péptido de 43 aminoácidos llamado Lunasina, que ha demostrado tener

actividad anticancerígena promisorio. Este nuevo péptido se encuentra en la fracción 2S de la proteína de soya y en concentraciones de 0.1 a 1.33 g/100g de harina en diferentes variedades de soya (41).

2.3.1.5. Actividad antioxidante.

Los péptidos antioxidantes son moléculas que inhiben la acción destructiva de los compuestos oxidantes, que se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas. Estos compuestos pueden generar daños en proteínas, lípidos y ADN. Cuando la presencia de los compuestos oxidantes es mayor a los antioxidantes se genera estrés oxidativo que ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades y con el envejecimiento (42), tal como se muestra en la figura 8.

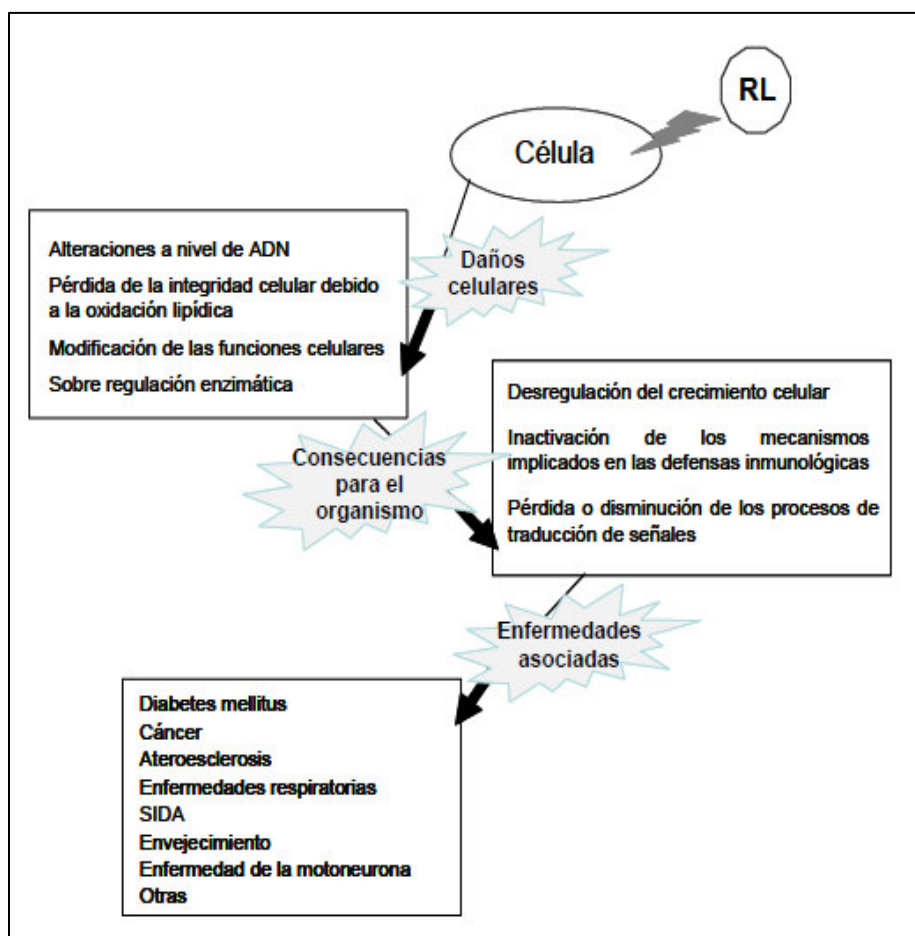


Figura 8. Generación de estrés oxidativo y su relación con enfermedades. Tomado de Ugartondo, 2009 (59).

Asimismo, la presencia de antioxidantes tiene gran importancia en los alimentos para mantener la calidad nutricional y funcional y evitar la peroxidación lipídica que produce rancidez con la aparición de sabores inaceptables para el consumidor y disminución de la vida comercial del producto (43).

Dado que la presencia de estrés oxidativo trae consecuencias negativas para la salud y también en los alimentos, se buscan nuevas fuentes naturales de antioxidantes que bien pudieran ser los péptidos antioxidantes. El mecanismo exacto de la actividad de estos péptidos no se conoce pero se ha reportado que tienen la capacidad tanto de secuestrar radicales libres como de formar complejos con los iones metálicos y que actúan como inhibidores de la peroxidación lipídica (44).

Los péptidos antioxidantes, son considerados compuestos inocuos, de bajo peso molecular, alta actividad biológica y fácil absorción. Estos presentan cierta ventaja frente a otros antioxidantes debido a que su estructura simple les confiere cierta estabilidad, presentando propiedades nutricias y funcionales adicionales a su actividad (40).

Se ha descrito también que las propiedades antioxidantes de estos péptidos se debe a su composición, estructura e hidrofobicidad, y a la presencia en su secuencia aminoacídica de prolina (Pro), metionina (Met), triptófano (Trp), lisina (Lys), histidina (His), cisteína (Cys) y tirosina (Tyr). Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a radicales deficientes de electrones, mejorando su propiedad de atrapar radicales libres. También se ha propuesto que la actividad de los péptidos que contienen Histidina y su grupo imidazol está relacionada a la donación de átomos de hidrógeno y/o su habilidad de quelación. Sin embargo, se ha postulado que la actividad antioxidante total debe atribuirse a los efectos de integración de estas acciones en lugar de las acciones individuales de los aminoácidos. La secuencia de referencia Pro-His-His (tabla 4) es la de mayor

actividad antioxidante (41). Así mismo se ha descubierto que los péptidos antioxidantes pueden ejercer un fuerte efecto sinérgico con otros antioxidantes como por ejemplo los compuestos fenólicos, carotenoides, entre otros (45).

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de péptidos con actividad antioxidante reportadas.

Fuente de péptidos	Secuencias reportadas	Referencia
Soya	Leu-Leu-Pro-His-His; Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Val-Asn-Pro-His-Asp-His-Gln-Asn; Leu-Leu-Pro-His-His	Wang & González de Mejía, 2005; Chen et al., 1995
Endospermo de arroz	Fen-Arg-Asp-Glu-His-Lis-Lis; Lis-His-Asp-Arg-Gli-Asp-Glu-Fen	Zhang et al., 2010
Garbanzo	Asn-Arg-Tir-His-Glu	Zhang et al., 2011
Colza	Pro-Ala-Gli-Pro-Fen	Bing-Zhang et al., 2009
Trigo Sarraceno	Trp-Pro-Leu; Val-Pro-Trp; Val-Fen-Pro-Trp Pro-Trp y Trp	Ma et al., 2010

Fuente: De Mejía, 2006 (41).

Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres. El estudio de péptidos antioxidantes ha despertado mucho interés y han sido obtenidos de distintas fuentes alimentarias como lácteos, cárnicos, leguminosas, cereales, entre otras. Sus hidrolizados han sido fraccionados y purificados, encontrándose gran variedad de péptidos conteniendo secuencias de 2 a 20 aminoácidos y con tamaños de 500 a 1800 Da (46).

2.3.2. Péptidos bioactivos en alimentos.

Los péptidos bioactivos no son más que una pequeña secuencia de aminoácidos encriptados en proteínas que han sido aislados de diferentes fuentes alimentarias (Tabla 5) de origen animal (la caseína, queso de suero de la leche, leche fermentada, músculo de pollo, pescado entre otras) como vegetal (gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, arroz, frijol, etc.). Estos péptidos presentan un abanico de actividades biológicas lo que ha despertado interés para el sector industrial (alimentos y farmacéutica) ya que podrían ser incluidos en diversos sistemas alimenticios y/o medicamentos para lograr su efecto en el organismo del consumidor final (47). Asimismo en los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado (tabla N°6), se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática in vitro, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (48). Incluso en estudios recientes se han sintetizado péptidos, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (49). En este sentido, productos funcionales con péptidos biológicamente activos están disponibles en el mercado y el tipo y la cantidad de los mismos depende de la fuente proteica utilizada así como del grado y tipo de hidrolisis empleado (48).

Tabla 5. Péptidos biológicamente activos derivados de proteínas alimentarias.

EFFECTO	ORIGEN	NOMBRE/ SECUENCIA
Inhibidores de ECA	Soja Pescado Carne Leche Huevo	NWGPLV LKP,IKP,LRP (derivados de sardina, atún, calamar) IKW, LK Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP) Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP) Ovokinina (FRAHPPL) Ovokinina (2-7)(KVREGTTY)
Inmunomoduladora	Trigo brócoli arroz leche	IAP YPK GYPMYPLR Immunopéptidos (immunocasoquinina) TTMPLW
Citomoduladora	leche	α -Casomorfina (HIQKED) β -casomorfina-7 (YPFPGPI)
Opioides agonistas	Leche trigo	Exorfinas A4, A5(GYYPT), B4, B5 α -lactorfinas, β -lactorfinas Casomorfinas
Opioides antagonistas	Leche	Lactoferroxina Casoxinas
antimicrobianos	Huevo leche	Otap-92(f109-200) Lactoferricina
Antitromboticos	Leche	K-CN(f106-116), casoplatelinas.
Quelantes de metales, Anticariogénico	Leche	Caseinofosfopéptidos
Hipocolesterolemicos	Soja leche	LPYPR IIAEK
Antioxidantes	Pescado leche	MY MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI

Fuente: Hartman y Meisel, 2007 (48).

Tabla 6. Productos con péptidos bioactivos disponibles en el mercado.

Nombre del producto	Fabricante	Tipo de alimento	Alegación de salud
Calpis AMEELS* O Calpico	Calpis, Japón	Leche amarga	Hipotensores
Evolus	Valio, Finlandia	Leche fermentada enriquecida con calcio	
Biozate	Davisco, EEUU	Hidrolizados de β -LG	
C12 Peption	DMV, HOLANDA	Ingrediente	
Peptide soup	Nipon, Japón	Sopa	
Casein DP Peptio Drink	Kanebo, Japón	Refresco	
Bio-PURE-GMP	Davisco, EEUU	hidrolizado proteico de suero	Anticariogénico Antimicrobiano
CholesteBLOCK	Kyowa, Japón	Bebida en polvo	Hipocolesterolemico.
CSPHP PROFJET-F200	Ingredia, Francia	Bebida de leche, confitería	Reductores de estrés
Capolac	Aria food, Dinamarca	Ingrediente	Mejora la absorción mineral
Kotsu calcium	Asahi, Japón	Refresco	
Glutaminpeptide WGE80GPA WGE80GPN	DMV, Holanda	Hidrolizado proteico de leche.	Inmunomoduladora

Fuente: Hartman y Meisel (2007) (48).

2.3.3. Obtención de péptidos mediante hidrólisis enzimática.

Se conoce que los péptidos bioactivos pueden ser derivados de las proteínas de la dieta a través de métodos químicos, fermentativos o mediante hidrólisis enzimática, siendo esta última la más utilizada para muchos propósitos, tales como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios, formular productos farmacéuticos y de aplicación clínica específica, reducir la alergenicidad de la proteína y obtener péptidos bioactivos con diversas funciones biológicas (47).

La hidrólisis enzimática es un proceso muy eficiente que a diferencia de otros métodos no necesita condiciones extremas para su realización, pudiéndose llevar a cabo en condiciones suaves de temperatura y pH. La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan, a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis, a medida que esta progresa, el pH desciende debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En la hidrólisis el pH debe mantenerse siempre en el óptimo de la proteasa y esto se logra mediante la adición de una base diluida (50).

La hidrólisis enzimática no se realiza en una sola reacción, ésta se realiza en un conjunto de reacciones consecutivas que se dan hasta romper los enlaces peptídicos. Se ha propuesto una secuencia de tres reacciones consecutivas (Figura 9) donde la unión enzima-sustrato es esencial, sin embargo en caso de proteínas globulares, donde hay enlaces peptídicos que están dentro de la enzima y no se encuentran accesibles para la enzima es más complicado. *Linderstrøm-Lang* propone un segundo proceso (Figura 10) donde es necesario efectuar previamente la desnaturalización de la proteína globular antes de proceder a hidrolizarlos (51).

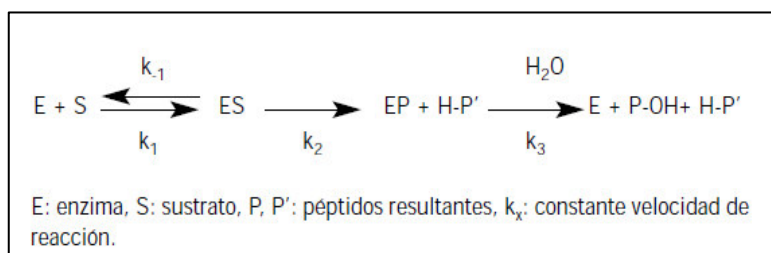


Figura 9. Mecanismo catalítico de una proteasa. Tomado de Benítez y col, 2008 (50).

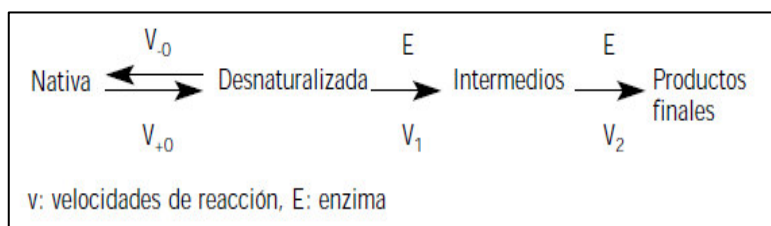


Figura 10. Teoría de Linderstrøm-Lang para hidrólisis de proteína globulares. Tomado de Benítez y col. 2008 (50).

Para finalizar la hidrólisis proteica, la enzima debe ser inactivada, ya sea por calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. También puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada (50).

La propiedad fundamental de todo hidrolizado proteico es el grado de hidrólisis, que se puede definir como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original, y que de acuerdo al grado que pueda alcanzar se define su posible uso. El grado de hidrólisis está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. (50)

Los hidrolizados proteicos se pueden dividir en tres grandes grupos siendo: a) Hidrolizados limitados, con grados de hidrólisis menores del 10%, que son utilizados para la mejora de las propiedades funcionales. b) Hidrolizados para su uso, como flavorizantes con grados de hidrólisis variable y c) Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis mayor al 10%, utilizados en alimentación especializada (52).

2.3.3.1. Enzimas proteolíticas.

Para lograr el GH deseado, existe disponible en el mercado un sin número de enzimas de grado alimentario (Tabla 7), pudiendo clasificarse de distintas formas: a) por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), b) por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o en base a su sitio catalítico (Serin-, Metallo-, Cistein-,Asparto-proteasas).(50)

Tabla 7. Proteasas comerciales de grado alimentario.

Tipo de proteasa		Nombre	Fuente	Temp. (°C)	Intervalo de pH.	Sitio de acción catalítico.
Serinproteasa	Animal	Tripsina Quimotripsina Elastasa	Porcino, bovino	30-60 45-55	7-9 8-9 6-8	-*Lis (o Arg)-- -*Trp (o Tir, Fe,Leu) --- -Ala---
	Bacteriana	Substilisín. Carlsberg, Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	-*AAhf----
		Subst. BPN, Substilisín Novo	<i>Bacillus Amylolyque- faciens</i>	40-55	6-10	-*AAhf----
Cisteinproteasas	Plantas	Papaína Bromelaina Ficina	Papaya Piña Látex de Ficus	40-75 20-65	5-8 5-8 5-8	-*Fe (o Val, Leu)- AAhf ---
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina Quimosina	Porcino, bovino Becerro	35-50	1-4 4-6	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp (o Fe, Tir)
	Fúngica	Aspergillopeptidasa A Newlasa	<i>Aspergillus saitoi</i> <i>Rhizopus</i> sp.	40-50	2-5 3-6	-Glu, Asp, Leu *--- Similar a la pepsina

Metalo proteasas	Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas	40-55	7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
	Bacteriana	Neutrasa® Termolisina	- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - <i>B. thermo- proteolyticus</i>	40-55	6-7,5 7-9	-Fe, Leu, Val*--- -Ile, Leu, Val, Fe*--
Preparaciones enzimáticas Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima. Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa. Mezcla de serin-, aspartato y metalo-proteasas. Mezcla de endo- y exo-proteasas, actividad en pH Alcalino y neutro.		Papaína cruda	Fruto de la papaya	30-80	5-9	Amplia especificidad
		Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)		7-9	Muy amplia especificidad
		Veron P, Sumicina LP,	<i>Aspergillus oryzae</i> .	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
		Biocina A Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	Muy amplia especificidad

Fuente: Benítez y col, 2008 (50).

* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato.

AAhf Indica AAs hidrofóbicos.

En ese sentido, se puede decir que clasifican mayoritariamente a las enzimas según su actividad catalítica siendo: a) endopeptidasas o proteinasas, aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos internos de las cadenas peptídicas y exopeptidasas o peptidasas si hidrolizan aminoácidos y dipeptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas y estas a la vez pueden subdividirse en aminopeptidasas si actúan por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo C-terminal.(figura 11). (35)

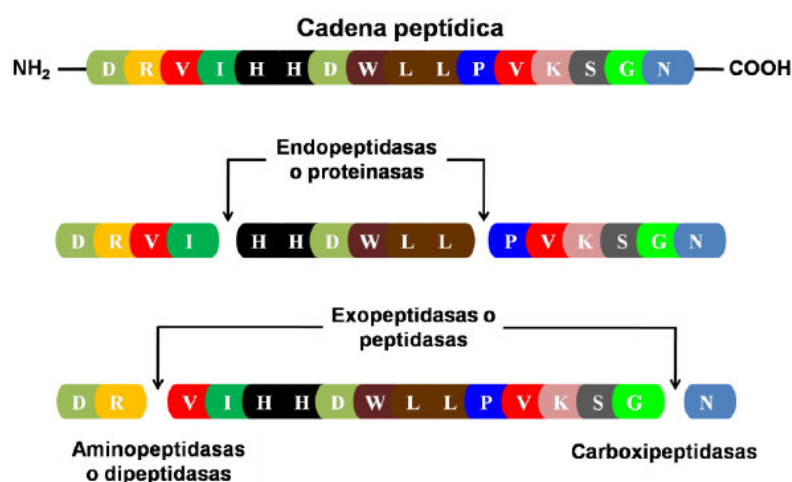


Figura 11. Clasificación de enzimas según su actividad catalítica.
Tomado de Torruco-Uco. 2009 (35).

La especificidad de la enzima no daña la composición de péptidos y aminoácidos libres, así como su secuencia de aminoácidos (53), sin embargo la hidrólisis enzimática de proteínas frecuentemente conduce a la producción de un sabor amargo debido a la presencia de péptidos fuertemente hidrofóbicos. Por otro lado la reducción del número de aminoácidos aromáticos en los hidrolizados proteínicos mejora su sabor, el cual es un factor importante para su uso en futuras formulaciones de una dieta especial (54). Para poder lograr lo anterior, se hace uso de enzimas comerciales como Alcalasa, Flavorzima y/o un sistema secuencial de éstas, alcanzando un alto GH. (55).

3. Tendencia de los péptidos bioactivos

La ciencia de los alimentos nos indica que hoy en día el concepto de la dieta ha cambiado, de ser solo un mecanismo de nutrición a tener un papel importante en la modulación de varias funciones de nuestro organismo. Esto implica que la dieta y/o sus componentes puedan contribuir a un mejoramiento del estado de bienestar, una reducción de riesgos relacionados con ciertas enfermedades e incluso un mejoramiento en la calidad de vida. Esto nos lleva a hablar acerca de alimentos promotores de la salud, es decir, los alimentos funcionales (Figura 12) (56).

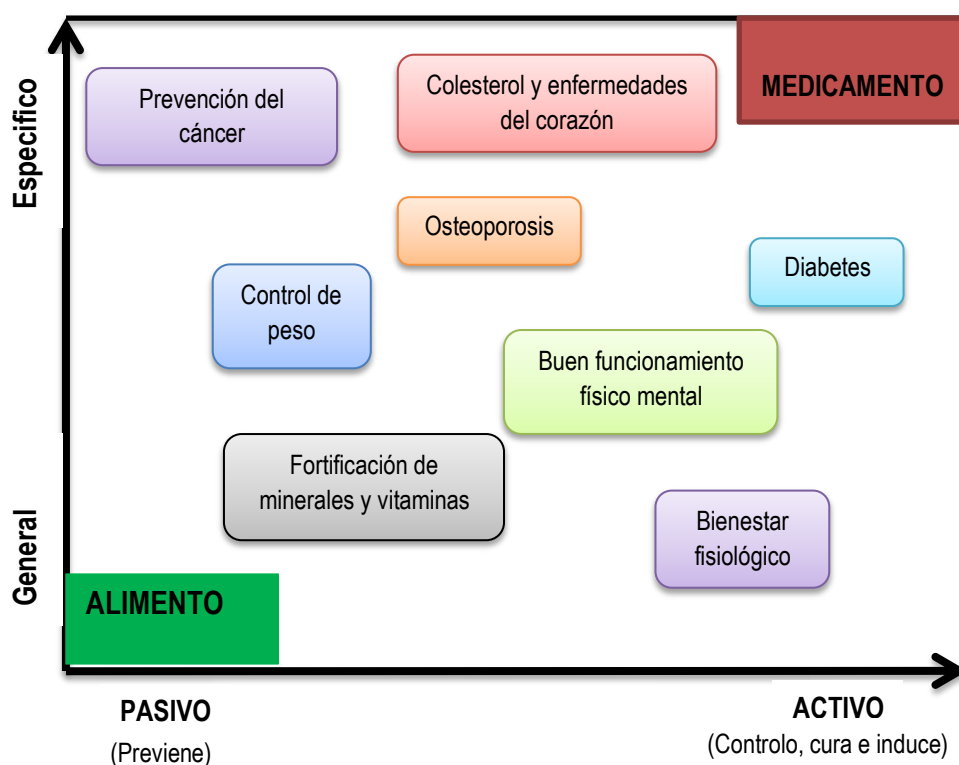


Figura 12. cambio del papel de los alimentos según su actividad, como medicamento. Tomado de Torruco-Uco, 2009 (35).

Los péptidos bioactivos sin duda alguna tienen un futuro altamente prometedor en el área de los alimentos funcionales. Científicos, Industria y consumidores, ven la posibilidad de mejorar la salud o prevenir enfermedades mediante una alimentación más saludable; la oportunidad de ampliar su mercado y diversificar su oferta con la opción de productos elaborados con un alto valor añadido; así como la oportunidad de encontrar nuevas fuentes que sirvan como materia prima para la generación de estas fracciones proteínicas. En ese sentido hemos podido apreciar una gran variedad de productos funcionales a base de péptidos bioactivos en el mercado competitivo funcional (Figura 13) (57).



Figura 13. Productos alimenticios y de higiene bucal con péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante y anticariogénicos.

2.3.4. Ensayos químicos para demostrar Actividad antioxidante

Existen diferentes métodos para poder determinar la actividad antioxidante, ya sea *in vivo* o *in vitro*, siendo esta última una de las estrategias más utilizadas. La determinación *in vitro* de manera general consiste en la determinación de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración del antioxidante (58).

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS, DPPH, DMPO, FRAP y ORAC.) son utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los distintos tipos de alimentos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos perjudiciales en los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (EROS) (58).

Así mismo se conoce métodos para la determinación de la actividad antioxidantes *in vitro*, entre las cuales son más conocidos los métodos químicos (59), que se pueden clasificar como:

- 1) Ensayo de capacidad secuestradora contra ROS/RNS específicos:
 - a.- TRAP (Total radical-parameter).
 - b.- ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)
 - C.- Ensayos basados en la química de luminol
 - d.- Ensayos de oxidación LDL.
- 2) Ensayos de capacidad secuestradora contra radicales estables, no biológicos y evaluación de la capacidad reductora total.
 - a.- radical ABTS (TEAC)
 - b.- radical DPPH
 - c.- Ensayo FRAP
 - d.- ensayo FC (Folin-ciocalteu)

2.3.4.1. Método ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico)

En este método, el producto de la oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida $\text{ABTS}^{\cdot+}$, se presenta como una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de moléculas donadores de hidrógeno. El método original de ABTS estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Un formato más apropiado para el ensayo consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes. La técnica mejorada para la generación del radical catión $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Figura 14), implica la producción directa del cromóforo $\text{ABTS}^{\cdot+}$ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (60).

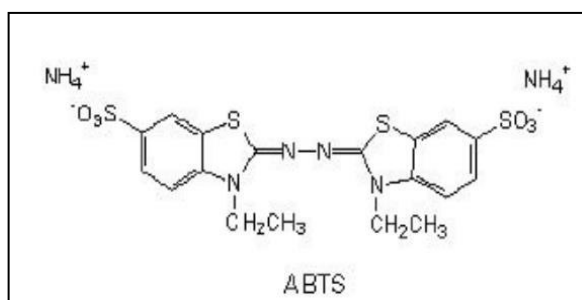


Figura 14. Radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

2.3.4.2. Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo):

El DPPH es una molécula radical estable de color púrpura, que se prepara en solución metanólica o etanólica. En esta forma su pico de absorbancia está entre 515 – 520 nm. Cuando se coloca frente a una sustancia estabilizadora de radical libre, el DPPH (Figura 15) pierde la coloración púrpura y se torna finalmente a una solución de color amarillo. El método es sencillo, rápido y confiable, puede aplicarse a muestras de variada polaridad. Es uno de los métodos más reportados en los ensayos in vitro de capacidad captadora de radicales expresado usualmente como capacidad antioxidante total (61).

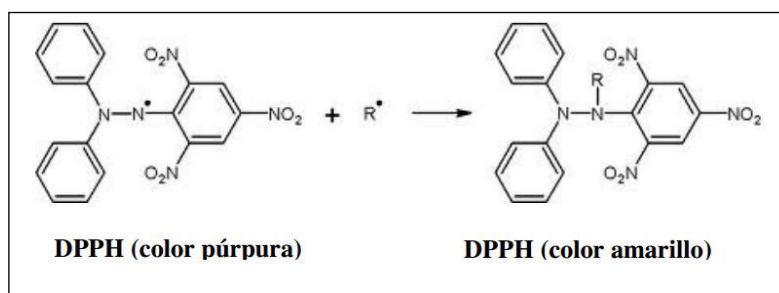


Figura 15. Radical DPPH

2.3.4.3. ORAC (Capacidad de absorción de radicales oxígeno).

El método ORAC consiste en medir la disminución de la fluorescencia en función al tiempo de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO^\bullet). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. La proteína usada es la fluoresceína (FL). El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), para generar el radical peroxilo, ROO^\bullet . La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxilo. En presencia de un antioxidante, ROO^\bullet capta, preferiblemente, un átomo de hidrógeno del antioxidante estable. Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxilo es inhibida (Figura 16) (62).

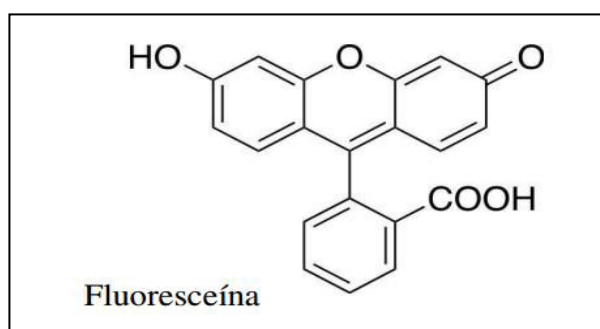


Figura 16. Reactivo de Fluoresceína

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La figura 17 muestra la metodología que se desarrolló en el presente trabajo de investigación, desde la preparación de la harina de pajuro hasta la obtención de las fracciones peptídicas y la evaluación de actividad antioxidante por el método ABTS+ y ORAC. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados reportados se expresaron como un promedio de los valores \pm error estándar.

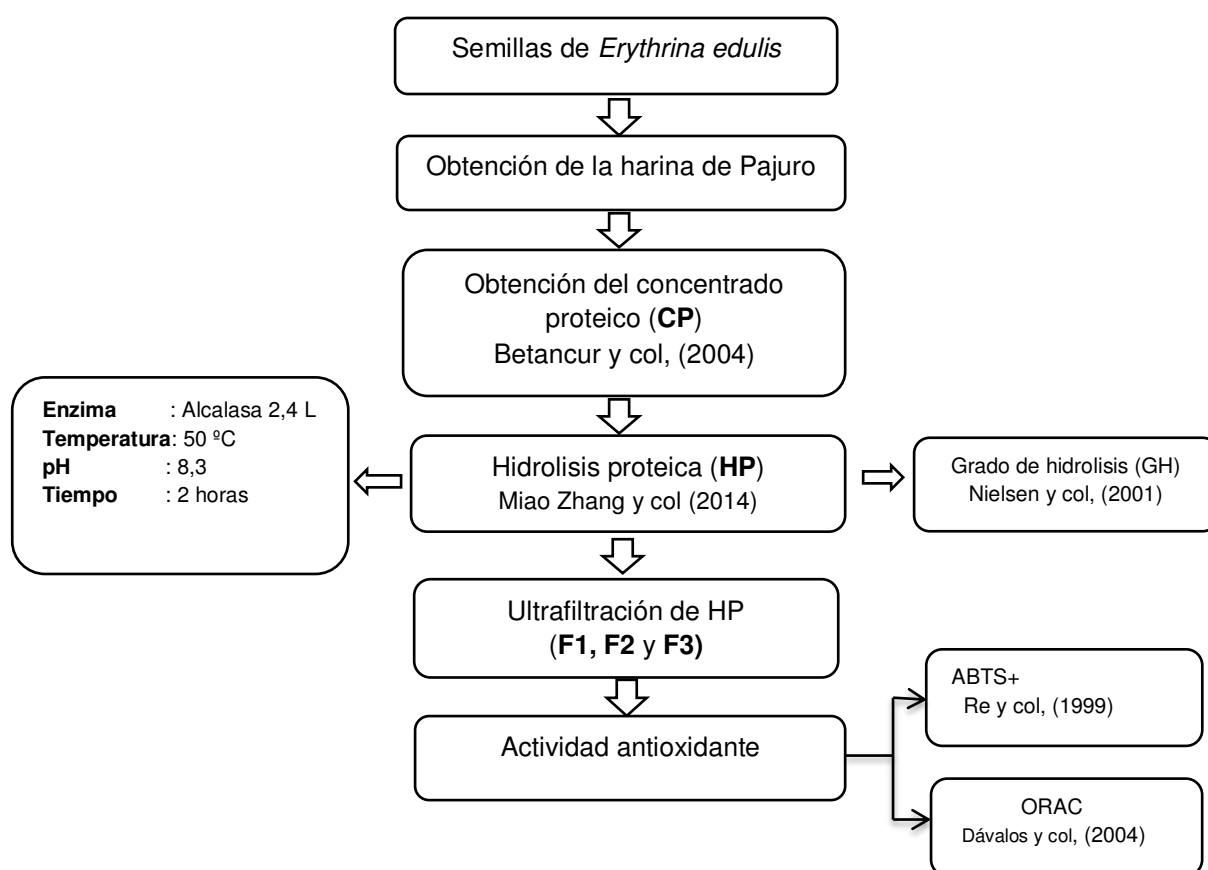


Figura 17. Metodología experimental para la evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas del hidrolizado proteico de pajuro.

3.1. Obtención de la harina de pajuro

Los granos de Pajuro, se colectaron de la provincia de Otuzco, (Ubicada a 2641 m.s.n.m.) en el departamento de La Libertad (Figura 18), procedente de la cosecha 2014. Las semillas fueron previamente seleccionadas y desinfectadas, seguidamente fueron peladas, cortadas y colocadas en bandejas de papel para luego ser secadas en la estufa durante 15 días a 40 °C, removiendo los granos cada día y cambiando de papel las veces que fuese necesario (Anexo 1). Una vez secas las semillas fueron trituradas en un molino convencional marca Corona hasta obtener un tamaño capaz de atravesar un tamiz con una malla N° 60, se almacenó a temperatura ambiente en un frasco oscuro hasta su uso.

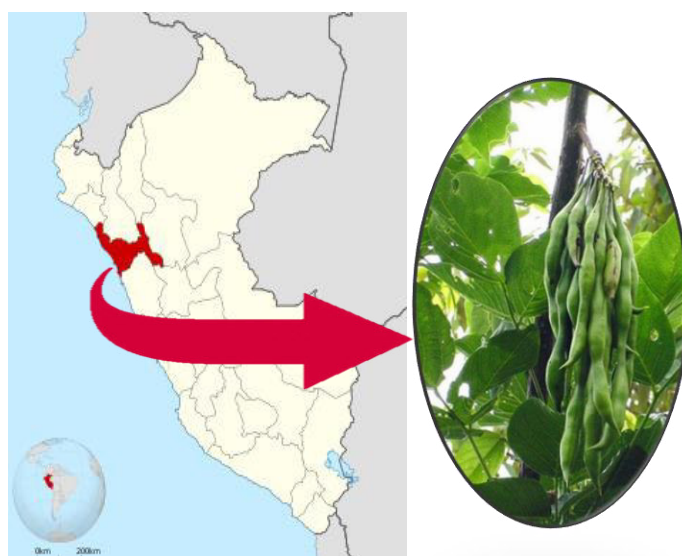


Figura 18. Recolección de las semillas de pajuro

Al finalizar el proceso de la obtención de la harina, se evaluó el rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso granos inicial (g)} - \text{peso de harina final (g)}}{\text{Peso granos inicial (g)}} \times 100$$

3.2. Análisis proximal de la harina de *Erythrina edulis*

El análisis proximal, se realizó en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, según el método de la AOAC 1997.

3.3. Obtención de concentrado proteico de pajuro

a) Fundamento

Para la obtención de las proteínas de las leguminosas, se deben eliminar los compuestos solubles no proteínicos presentes en la harina, quedando así un producto rico en azúcares insolubles y proteínas (63). Para la extracción de las proteínas se pueden aplicar algunos de los siguientes métodos:

- Lavado alcalino y precipitación en el punto isoelectrico de las proteínas
- Lavado con agua después del tratamiento térmico
- Tratamiento con soluciones hidroalcoholicas

De los métodos mencionados anteriormente, la precipitación isoelectrica es la alternativa más favorable ya que permite el uso integral del grano de las leguminosas, y se obtiene un producto rico en proteínas, almidón y fibra (64). El medio alcalino (pH 11), favorece la solubilización de las proteínas desnaturalizadas, que luego se precipitan en su punto isoelectrico, y después se separan por centrifugación o filtración (Figura 19) (65).

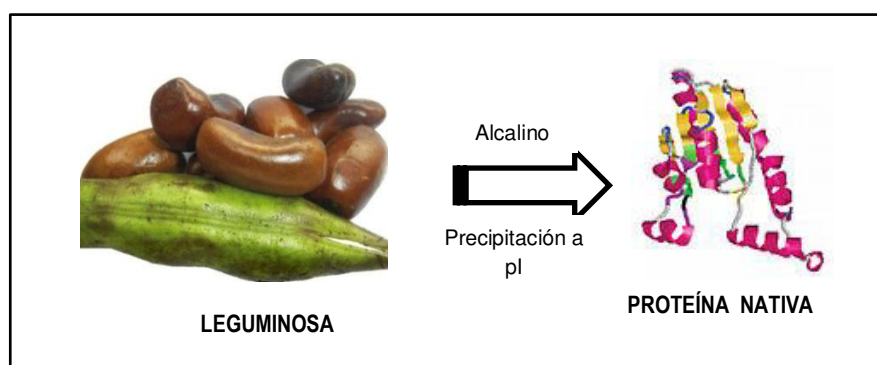


Figura 19. Extracción de proteínas en medio alcalino

b) Procedimiento

Para la obtención del concentrado proteínico (CP) de pajuro se empleó el método reportado por Betancur y *col.* (2004) (64) con modificaciones (Anexo 2). Se preparó una suspensión de harina de pajuro con agua destilada en una relación 1:6 (p/v) y se homogenizó por 30 min. Posteriormente, el pH se ajustó a 11 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 M y se llevó a un agitador magnético modelo RCO 10002 marca Ika-Combimag. Pasado este tiempo se procedió a reducir el tamaño de las partículas suspendidas utilizando una licuadora modelo BL999 marca Imaco con intervalos de 1 minuto en una cámara refrigerada por un tiempo de 3 min. Seguidamente la suspensión se sonicó con ayuda de un equipo marca Branson por un tiempo de 3 min. Posteriormente la suspensión se pasó secuencialmente a través de los tamices de malla N° 80 y 100 respectivamente para permitir la separación del bagazo (rico en fibra), el cual se lavó tres veces con agua bidestilada. Seguidamente, se dejó sedimentar la suspensión por 2 h en una pera de decantación en una cabina de frío a 10 °C, Transcurrido el tiempo de reposo, se decantó el sobrenadante y se ajustó el pH a 4.5 con HCl 1N, Posteriormente se colocó en una Centrífuga modelo 5810R (EPPENDORF) a 1320 g durante 12 min a 4 °C para recuperar el precipitado, el cual

se secó a -47°C y 7×10^{-3} mbar en un liofilizador Labconco. Finalmente, el CP se almacenó a -20°C hasta su uso.

Al finalizar el proceso, se evaluó el rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{peso de harina inicial (g)} - \text{peso concentrado proteico final (g)}}{\text{peso de harina inicial (g)}}$$

3.4. Hidrólisis Enzimática del concentrado proteico

a) Fundamento

La hidrólisis enzimática es utilizada para mejorar las propiedades funcionales de los productos alimenticios, para obtener péptidos bioactivos con aplicación clínica específica. La hidrólisis enzimática presenta numerables ventajas frente a la hidrólisis química ácida o alcalina tradicional, entre ellas su selectividad, ya que son específicas para un tipo determinado de enlace, la rapidez del proceso, el costo moderado, y la posibilidad de obtener productos de alta calidad que pueden comercializarse a gran escala (63). Entre las estrategias empleadas para la obtención de péptidos con actividad biológica destacan la hidrólisis utilizando enzimas comerciales, los procesos de fermentación, la digestión gastrointestinal *in vivo* y la síntesis química basada en la secuencia de péptidos cuya actividad ya haya sido estudiada.(65)

La hidrólisis ocurre en condiciones moderadas de temperatura ($40 - 60^{\circ}\text{C}$) y pH entre 4-8), no se añaden sustancias extrañas, y lo más importante, se incrementa el valor nutritivo de la proteína.

La hidrólisis proteolítica hasta la obtención de péptidos se desarrolla en un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos (Figura 20).

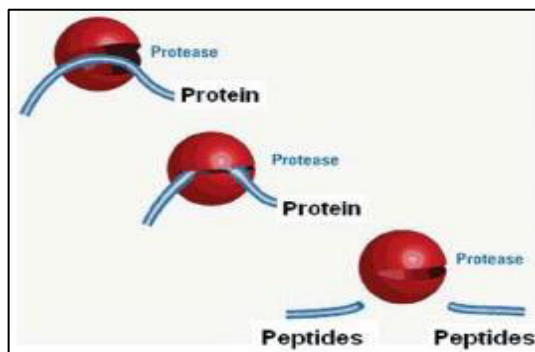


Figura 20. Mecanismo de acción de la hidrólisis proteica tomado de Ugartondo, 2009 (59).

b) Procedimiento

Se realizaron estudios preliminares para determinar la mejor enzima que nos otorgaría un hidrolizado de proteína de pajuro con propiedades antioxidantes (Anexo 3) para lo cual se utilizaron distintas enzimas comerciales como: alcalasa, flavorzima y neutrasa, obteniendo mejores resultados con la primera, por lo que fue elegida para realizar el presente trabajo de investigación.

El concentrado proteico 4% (p/v) fue hidrolizado el CP con la enzima comercial Alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*; actividad específica de 2.4 UA/g, Sigma-Aldrich) en una relación enzima/sustrato de 1:200 (v/v), a pH 8.3 y 50 °C por un tiempo de 2 h. Para realizar un seguimiento de la hidrólisis enzimática se tomaron muestras en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min y se les evaluó el contenido de proteína, el grado de hidrólisis y el perfil electroforético para así garantizar la calidad del producto obtenido. La hidrólisis se desarrolló según el esquema que se presenta en el Anexo N° 4.

3.5. Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes del mismo y por tanto su posible uso. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El GH final está determinado por las condiciones del ensayo, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación, el pH y la temperatura.

Los métodos para medir el GH se basan en: la determinación de los grupos α -amino libres, la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético y la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH, siendo el primero el más usado según los estudios revisados (66).

Determinación de los grupos amino libre

a) Fundamento

La cantidad de grupos α -amino liberados puede ser medida usando reactivos que reaccionen específicamente con grupos amino, produciendo derivados que pueden ser detectados espectrofotométricamente. Para ello puede utilizarse la valoración con formol, aunque el gran número de interferencias que presenta este método lo desaconsejan en el caso de los hidrolizados de proteínas. También se utilizan reactivos como ninhidrina, ortoftaldialdehído (OPA) y ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), que reaccionan con los grupos amino libres. Para este trabajo se escogió el método de OPA propuesta por Nielsen *et al*, (2001) (67) con algunas modificaciones, para la determinación del %GH, por la rapidez y seguridad que representa en relación con otros métodos reportados.

b) procedimiento

El reactivo de OPA fue preparado con 1.905 g de tetraborato de sodio, 50 mg de SDS y 37,5 mL de agua destilada, por otra parte, se disolvieron 40 mg de OPA en 1 mL de etanol. Previo a la determinación, se mezclaron las soluciones preparadas y se agregó 88 mg de β -mercaptoetanol, La mezcla se completa hasta 50 mL con agua destilada.

Se preparó una curva de calibración empleando L-Serina a diferentes concentraciones (Tabla 8) disolviendo 30.6 mg en 30 mL de agua destilada y realizando un dilución 1:10 (v/v).

Se agregó 750 μ L del reactivo de OPA y 100 μ L del estándar, seguidamente fueron agitados en un vórtex durante 5 segundos y las absorbancias fueron leídas a 340 nm, después de 2 min.

Tabla 8. Preparación de curva de L-Serina

	L-Serina (μ L)	H ₂ O (μ L)	[] de L-Serina (mg/mL)
Blanco		100	
Tubo 1	12,5	87,5	0,0125
Tubo 2	25	75	0,025
Tubo 3	50	50	0,050
Tubo 4	75	25	0,075
Tubo 5	100	0	0,100

Para evaluar el GH del CP se agregaron 750 μ L del reactivo de OPA y 100 μ L del hidrolizado proteínico. Esta solución se agitó durante 5 segundos y se colocó 200 μ L en cada pocillo y se leyó a 340 nm luego de 2 min en un Lector multipocillo modelo Infinite M200PRO (TECAN).

Las absorbancias fueron empleadas para hallar la concentración de grupos aminos libres que están presentes en el hidrolizado. Para lo anterior, se utilizó la ecuación de la recta que se obtuvo de la curva de calibración de L-serina. Finalmente, se aplicó la siguiente fórmula para hallar el GH (%):

$$\%GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100$$

Dónde:

h : La concentración de grupos aminos libres medida en las muestras

h_{total} : El número total de grupos aminos libres presentes en el CP de pajuro y se obtiene hidrolizando la muestra al 100%.

Los grupos aminos libres totales en el CP se obtuvieron mediante hidrólisis ácida, empleando HCl 6N con 0.1% de fenol (1:100 V/V), a 150 °C y un tiempo de 6 horas bajo condiciones de vacío, en un equipo específico de hidrolisis “Reacti-Term” marca Pierce, la determinación de los grupos amino libre totales se efectuó con la misma metodología de Nielsen y col (2001).

3.6. Electroforesis SDS-PAGE

a) Fundamento

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas y la determinación de peso molecular, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por polimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDSPAGE), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia (68)

b) Procedimiento

Se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para el análisis electroforético del CP y su hidrolizado, de acuerdo al método de Laemmli (1970) (69). Se prepararon soluciones de trabajo, la Solución A: Solución de acrilamida-bisacrilamida (30% T y 0.8% C); Solución B: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 con 0.4 % SDS y la Solución C: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 con 0.4 % SDS, persulfato de amonio (APS) 10%, tampón de electroforesis, tampón de carga, colorante azul de coomassie (2.5 g azul brillante de coomassie R-250, 450 mL metanol, 100 mL ácido acético glacial y aforar hasta 1 L con agua destilada).

De igual forma, se utilizaron 3 μ L de muestra estándar de marcadores de peso molecular conocido (Sigma MarkerTM widerange S8445).

El protocolo para la preparación de los geles de SDS-PAGE en tampón glicina se resume en la Tabla 9.

Tabla N° 9. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Gel de empaquetamiento (5%)	Gel de separación (10%)	Gel de separación (12%)
Solución A	250 µL	1.5 mL	1.8 mL
Solución B	-	1.5 mL-	1,5 mL
Solución C	500 µL	-	-
Agua destilada	1,25 mL	3 mL	2.7 mL
Persulfato de amonio (10%)*	15µL	30 µL	30 µL
TEMED	5 µL	12µL	12µL

*preparado el mismo día

Una vez polimerizada el gel de poliacrilamida, 10 µg de la proteína a añadir se mezcla con el tampón de carga 5X. A continuación las muestras se calentaron a 100°C durante 4 min y se cargaron en los pocillos del gel de empaquetamiento.

La electroforesis se realizó en tampón tris-HCl 25 mM a pH 8.4, glicina 0.19 M y SDS 0.1 % a un voltaje constante de 100 mV durante 60 min a temperatura ambiente.

Para la visualización de las proteínas después de la electroforesis los geles se colocaron con el colorante azul de coomasie durante 1 h, seguidamente los geles se decoloraron en una solución de Ácido acético / metanol en una concentración de 10%, hasta la aparición de un fondo transparente.

3.7. Obtención de fracciones peptídicas mediante ultrafiltración

Las proteínas se pueden separar mediante diversos procedimientos tomando en cuenta sus características estructurales y fisicoquímicas tales como; solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas biológicas (Figura 21) (70).

Entre los métodos de separación por tamaño molecular tenemos a la precipitación selectiva con sales, filtración en gel, ultra centrifugación y la ultrafiltración. Esta última es la que empleamos en el presente trabajo de investigación.

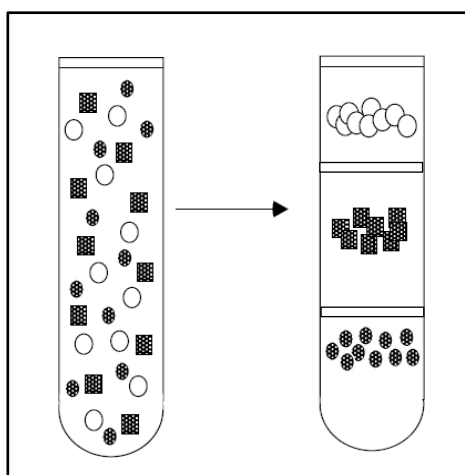


Figura 21. Separación de proteínas por tamaño molecular

a) Fundamento

Es una técnica de separación o concentración de proteínas que usa una membrana semipermeable y la fuerza de la gravedad. El tamaño de poro de la membrana determina el tamaño de la partícula que pasará a través de ella, obteniéndose al final del proceso un soluto “ultrafiltrado” (sustancia de menor tamaño que el poro) y un soluto “retenido” (sustancias de mayor tamaño que el poro) (71).

b) Procedimiento

Para este procedimiento se tomó 15 mL del HP a una concentración no mayor a 1 mg/mL, esta se colocó en un filtro de corte 10 kDa Macrosep® Advance Centrifugal Devices (Figura 22), seguidamente se centrifugó a 5 000 g por 60 minutos a temperatura de 20 °C, repitiendo el proceso las veces que sea necesario hasta que el aclaramiento de la muestra. Este procedimiento se repitió con el filtro de corte de 3 kDa, en este caso se utilizó el permeado anterior.



Figura 22. Tubos para ultrafiltración Macrosep Advance Centrifugal Devices.

Se obtuvieron tres fracciones peptídicas las que denominamos como: F1 (peso molecular $>10\text{kDa}$), F2 (peso molecular entre 3 y 10 kDa), F3 (peso molecular $<3\text{kDa}$) (Figura N°23).

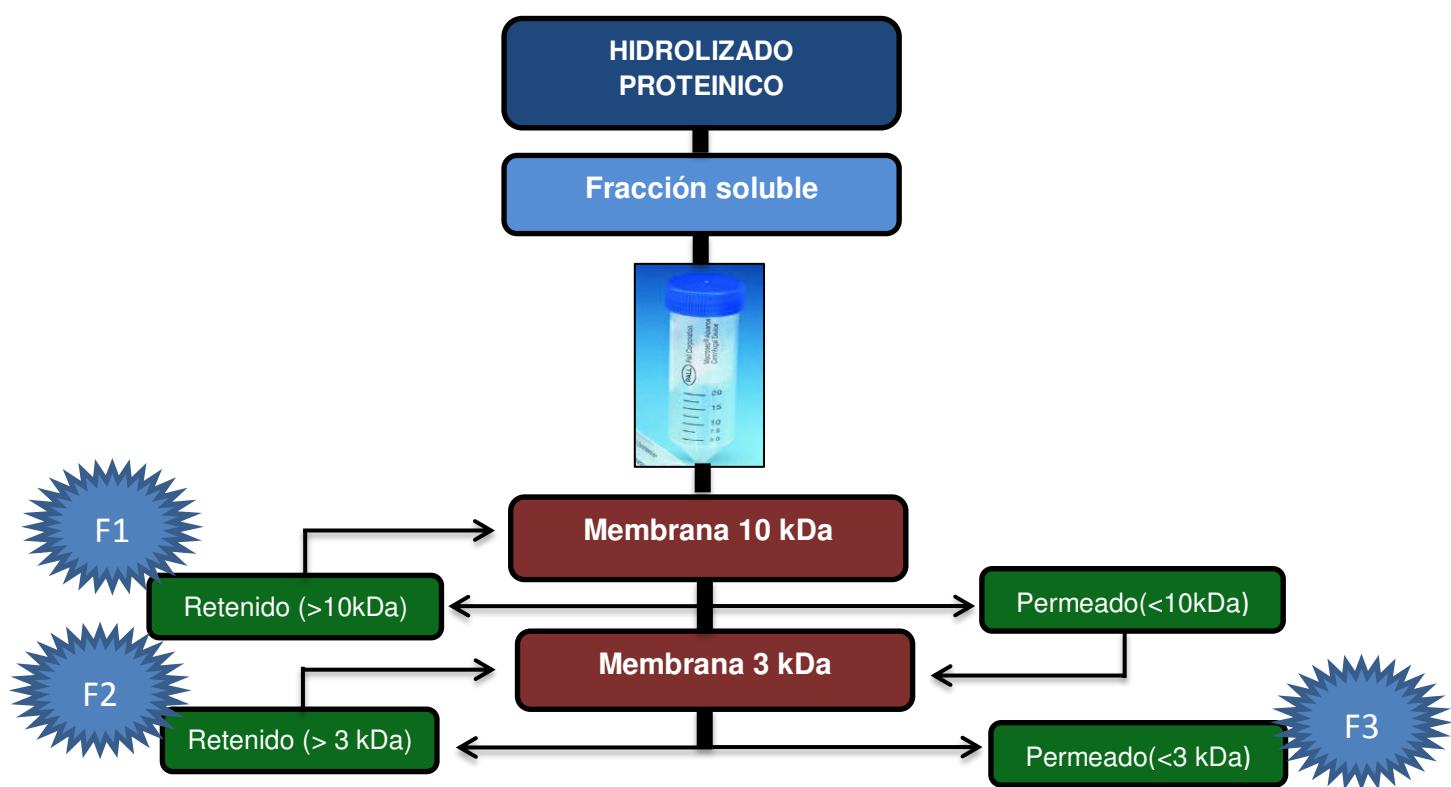


Figura 23. Procedimiento de ultrafiltración del hidrolizado proteico de pajuro. .

3.8. Evaluación de la actividad antioxidante

Método ABTS.

a) Fundamento

Este método es uno de los más utilizados para determinar la actividad antioxidante, fue reportado y desarrollado por Re y col. (1999) (72), y se fundamenta en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado ABTS^{•+}, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico) en persulfato de potasio, (Figura 24).

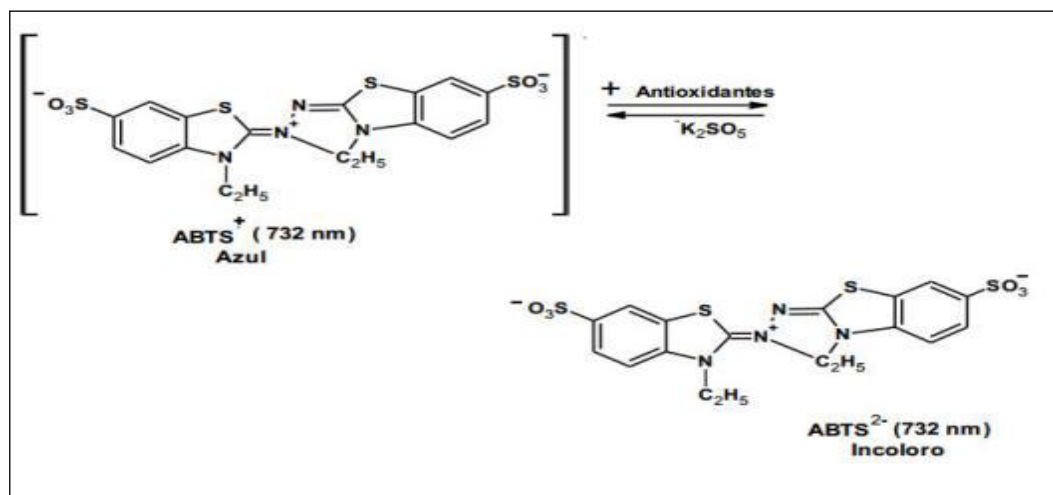


Figura 24. Estructura del ABTS^{•+} antes y después de la reacción con el antioxidante.

b) Procedimiento

EL CP, HP, F1, F2 y F3 liofilizadas se resuspende en agua destilada hasta obtener una concentración de 10 mg/ml. Luego a partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones dando concentraciones finales de 0.01; 0.02; 0,04; 0.06 y 0.08 mg/mL. Se mezcló 20 µL de muestra problema y 980 µL del reactivo del ABTS^{•+}. Como control se utilizó 20 µL de agua destilada y 980 µL de la solución de ABTS^{•+}. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 7 minutos en oscuridad. La lectura se determinó a 734 nm.

El porcentaje de actividad antioxidante se determinó de acuerdo a la ecuación que se presenta a continuación.

$$\% I_M = \left(\frac{A_b - A_M}{A_b} \right) \times 100$$

Luego se calculó la ecuación de la recta, representando el % de inhibición de la muestra y la concentración de antioxidante calculado. La pendiente de la ecuación se utilizó para calcular el valor TEAC (*Capacidad antioxidante Equivalente al Trolox*) interpolando en la recta patrón obtenida a partir de diferentes concentraciones de Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E).

Los valores finales resultados se expresaron en: Porcentaje de inhibición, TEAC-ABTS ($\mu\text{mol ET} / \text{mg}$ de muestra analizada), IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) y en VCEAC-ABTS (corresponden a mg Equivalentes a la vitamina C/g muestra) en este último caso por tratarse de alimentos.

Método ORAC

a) Fundamento

El método ORAC se fundamenta en la medida de la disminución de la fluorescencia de una proteína como la fluoresceína (FL) que da como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causado por una fuente de radicales peróxido (ROO^\cdot). El método mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. El mecanismo de la reacción se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno del antioxidante al radical libre. Por esto, se utiliza el radical iniciador, el AAPH, para generar el radical peroxilo, ROO^\cdot .

La pérdida de fluorescencia de la FL es el indicador de la extensión de la oxidación con el radical peroxilo. En presencia de un antioxidante, RRO^\cdot capta, preferiblemente,

un átomo de hidrógeno del antioxidante estable. Como consecuencia, la disminución de la fluorescencia de la FL por acción del radical peroxilo es inhibida (Figura 25) (73). La ecuación de la reacción se representa a continuación

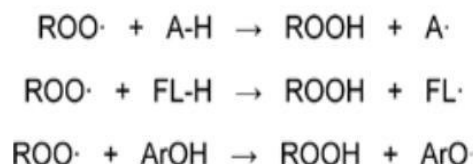


Figura 25. Las reacciones que tienen lugar en la determinación del ORAC

Dónde:

A-H: radical iniciador AAPH,

FL-H: compuesto fluorescente (FL)

ArOH: antioxidante.

b) Procedimiento

La actividad antioxidante mediante el método ORAC fue medido de acuerdo al procedimiento descrito por Dávalos et al, 2004 (74) con modificaciones. La metodología usa fluoresceína como sustancia fluorescente (ORAC_{FL}),

EL CP, HP y las fracciones liofilizadas se resuspende en agua destilada hasta obtener una concentración de 10 mg/ml. Luego a partir de esta solución se prepararon diferentes diluciones de 1/50, 1/100, 1/150, 1/200 y 1/300 (Figura 26).

Por cada reacción se tomó 25 µL de muestra problema y 150 µL de FL 40 nM, la mezcla se incubo durante 30 minutos a 37 °C, transcurrido el tiempo se agregó 25 µL de AAPH a 96 mM, La reacción se siguió cada 2 min durante 2 h a 37 °C, la fluorescencia se midió en un fluorometro modelo Infinite M200PRO (TECAN). A una longitud de onda de emisión y excitación de 520 y 485 nm, respectivamente. La curva

de calibración se realizó con Trolox en un rango de concentración de 0,2 - 5 nmol (concentración final). Las lecturas de la curva de Trolox y las muestras se realizaron simultáneamente (Figura 26) en una placa multipocillo de 96 marca Brand.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1 0.2ηM	T1 0.2ηM	T1 0.2ηM	CP 1/50	CP 1/50	CP 1/50	F1 1/100	F1 1/100	F1 1/100	F3 1/100	F3 1/100	F3 1/100
B	T2 0.6ηM	T2 0.6ηM	T2 0.6ηM	CP 1/100	CP 1/100	CP 1/100	F1 1/150	F1 1/150	F1 1/150	F3 1/150	F3 1/150	F3 1/150
C	T3 1.2ηM	T3 1.2ηM	T3 1.2ηM	CP 1/150	CP 1/150	CP 1/150	F1 1/200	F1 1/200	F1 1/200	F3 1/200	F3 1/200	F3 1/200
D	T4 2.5ηM	T4 2.5ηM	T4 2.5ηM	CP 1/200	CP 1/200	CP 1/200	F1 1/300	F1 1/300	F1 1/300	F3 1/300	F3 1/300	F3 1/300
E	T5 3.7ηM	T5 3.7ηM	T5 3.7ηM	HP 1/50	HP 1/50	HP 1/50	F2 1/100	F2 1/100	F2 1/100	Blanco	Blanco	Blanco
F	T6 5.0ηM	T6 5.0ηM	T6 5.0ηM	HP 1/100	HP 1/100	HP 1/100	F2 1/150	F2 1/150	F2 1/150	Blanco	Blanco	Blanco
G	Blanco	Blanco	Blanco	HP 1/150	HP 1/150	HP 1/150	F2 1/200	F2 1/200	F2 1/200	Blanco	Blanco	Blanco
	Blanco	Blanco	Blanco	HP 1/200	HP 1/200	HP 1/200	F2 1/300	F2 1/300	F2 1/300	Blanco	Blanco	Blanco

Figura Nº 26. Distribución de las muestras en microplaca donde: **A1-H3**, Concentración de Trolox 0.2 a 5.0 ηMol; **A4-D6**, diluciones 1/50 a 1/200 del CP; **E4-H6**, diluciones 1/50 a 1/200 del HP; **A7-D9**, diluciones 1/100 A 1/300 de la F1; **E7-H9**, diluciones 1/100 a 1/300 de la F2; **A10-D12**, diluciones 1/100 a 1/300 de la F3, **E10-H12**, los blancos de muestra.

A partir de las curvas de fluorescencia se calculó el AUC (*área bajo la curva*) utilizando la siguiente fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=60} f_i/f_0$$

Dónde:

AUC: Área bajo la curva

f₀: lectura de la fluorescencia inicial en el tiempo 0.

f_i: lectura de la fluorescencia correspondiente al tiempo i.

El área bajo la curva neta (AUC neta) se halló de la siguiente fórmula.

$$AUC_{\text{neta}} = AUC_{\text{antioxidante}} - AUC_{\text{blanco}}$$

Luego se calculó la ecuación de regresión entre el área neta y la concentración de antioxidante. La pendiente de la ecuación se utilizó para calcular el valor de ORAC-FL mediante la recta patrón obtenido a partir del Trolox. Los valores finales de ORAC se expresan en μmol de Trolox equivalentes (TE)/mg de muestra analizada.

3.3.9. Análisis Estadístico de los resultados

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y en tres experimentos diferentes. Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Student-Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$ para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SigmaPlot 11.0.

IV. RESULTADOS

Obtención de la harina de pajuro

El pajuro obtenido de la ciudad de Otuzco, fue secado para determinar la humedad previa a la molienda, obteniendo un valor de $64,16 \pm 0,02$ % con respecto al producto fresco. El rendimiento del proceso fue de 27,18% de recuperación a partir de la harina.

Análisis proximal de la harina de *Erythrina edulis*

El análisis proximal, se realizó en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, según el método de la AOAC 1997. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 10. Análisis proximal de la harina de pajuro

Prueba	Métodos	Porcentaje
Humedad	934.01	10.7
Proteínas	978.04	18.6
Grasas	930.09	1.31
Cenizas	930.07	3.95
Fibra	934.10	5.89
Elementos libre de Nitrógeno (ELN)	Por diferencia	59.54

Obtención del concentrado proteico

Se obtuvo el concentrado proteico de acuerdo al método descrito por Betancur y col (2004), con un rendimiento 38,81%, respecto a la recuperación de la proteína de la harina inicial. La integridad y pureza del CP se evaluó por medio de electroforesis

SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. En la Figura 27, se observa un perfil proteico constituido por 4 bandas predominantes de peso molecular de aproximadamente 55, 25, 20 y 18 kDa, las bandas son muy definidas, no presentan contaminantes y además nos permite verificar la repetitividad de los procesos de obtención del concentrado proteico de pajuro.

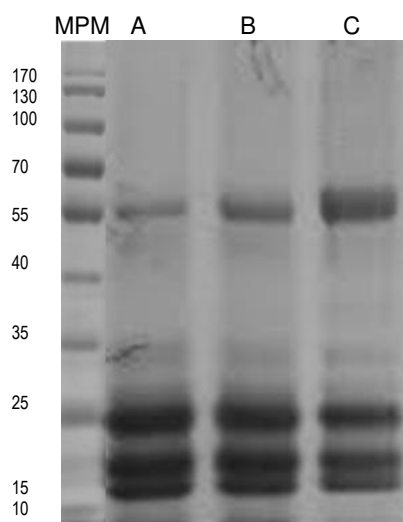


Figura 27. Patrón electroforético (SDS-PAGE) donde: MPM = marcador de peso molecular (kDa); A, B y C son muestras de CP de pajuro obtenidas en procesos independientes.

Hidrólisis enzimática

Para realizar un seguimiento de la hidrólisis enzimática se tomaron muestras en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos, en los cuales se evaluó el contenido de proteína, el grado de hidrólisis y el perfil electroforético.

La figura 28, muestra la hidrólisis enzimática de la proteína soluble del CP, con una concentración inicial de 12,91 mg/mL que fue disminuyendo hasta 0,42 mg/mL a los 120 minutos de hidrólisis.

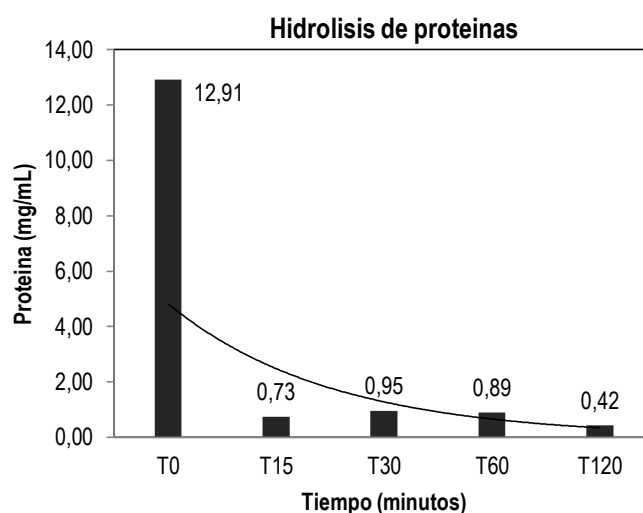


Figura. 28. Determinación de la concentración de proteínas durante la hidrolisis con alcalasa en muestras a diferentes tiempos

En la figura 29 se puede apreciar que durante la hidrolisis enzimática con alcalasa el perfil electroforético de las bandas del CP descritas anteriormente desaparece significativamente a medida que transcurre el tiempo de hidrolisis, Esto puede atribuirse a la actividad catalítica de la enzima, que da como productos a péptidos de tamaño menor a 10 kDa.

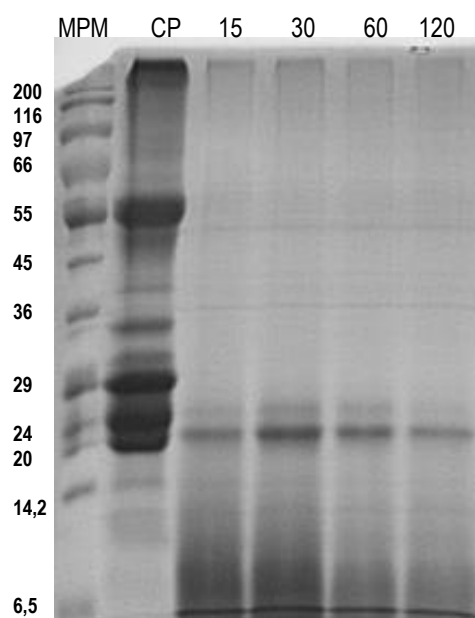


Figura 29. Electroforesis SDS-PAGE al 12% del hidrolizado del CP obtenido del grano de pajuro, donde: MPM (kDa) es el marcador de peso molecular, (CP), concentrado proteico y 15, 30, 60 y 120 min de hidrólisis con alcalasa.

Grado de hidrólisis.

En la figura 30, se representa el %GH alcanzado en la hidrólisis enzimática realizada con Alcalasa, según el método reportado por Nielsen y col. (2001), obteniendo un %GH de 15.37, 28.49, 39.60 y 44.60% en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min respectivamente.

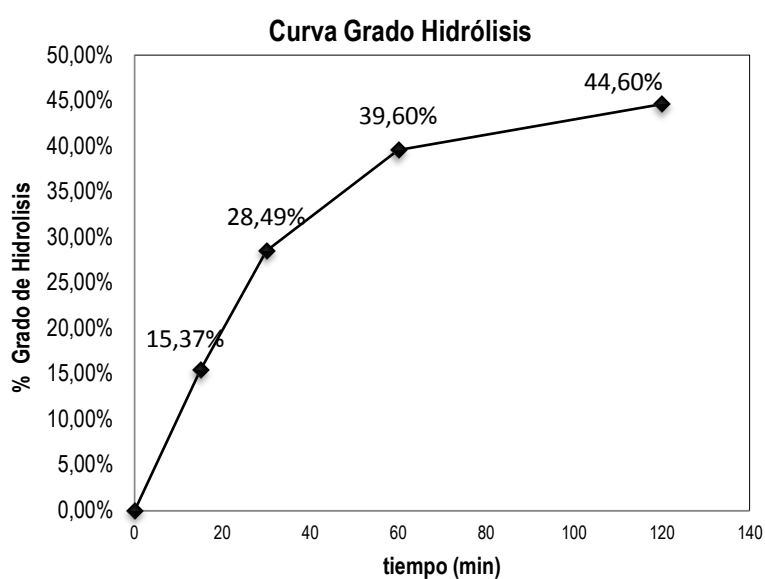


Figura 30. Curva % GH alcanzado con Alcalasa a tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos.

Se aprecia que el mayor %GH se alcanzó a los 120 min, y que a partir de 60 min el GH empieza a ser más constante llegando a una fase estacionaria. Esto puede deberse a la reducción del número de enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis, a la inhibición de la enzima por los productos y/o sustratos o la inactivación de la enzima.

Ultrafiltración.

Las fracciones obtenidas fueron las de tamaño molecular mayor a 10 kDa, entre 3 y 10 kDa y menor a 3 kDa, las cuales denotamos como F1, F2 Y F3, respectivamente (Figura 31).

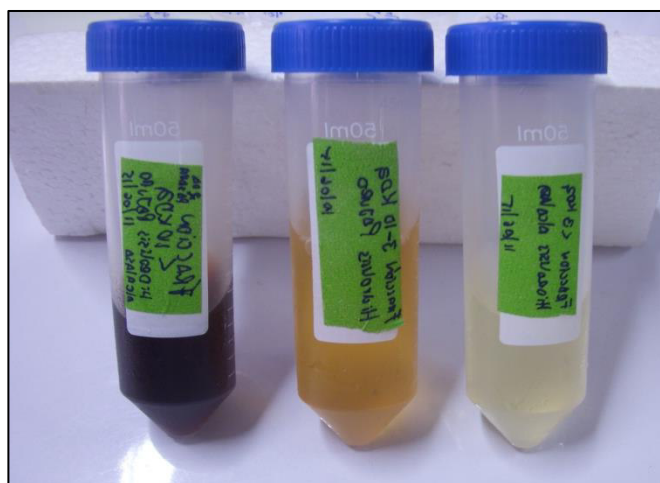


Figura 31. Fracciones peptídicas obtenidas luego de la ultrafiltración

Se puede observar que las fracciones presentaron distintas coloraciones, marrón oscura (F1), amarillo (F2) y blanquecino (F3). Esto se podría deber a que la concentración de proteínas en la F1 fue mayor a 1mg/mL, fracción que se fue permeando en las fracciones siguientes. Seguidamente se pasó a secar el HP y las tres fracciones en un liofilizador Labconco 2.5L.

Actividad antioxidante

Método ABTS+

En la Figura 32 se aprecia el % inhibición del radical ABTS+ para una concentración de muestra de 1 mg/mL del liofilizado del CP, HP y sus fracciones (F1, F2 y F3). Respecto al % de inhibición del CP y el HP, estas fueron 20.42 ± 0.70 y 29.89 ± 0.54 respectivamente, ésta última se incrementó de forma significativa ($p < 0.05$) en un 46% en relación a CP. La fracción F3 fue capaz de inhibir el radical ABTS+ en más del doble en relación a F1 de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$), obteniendo un % inhibición de 48.24 ± 0.58 frente al $21.49 \pm 2.61\%$ respectivamente.

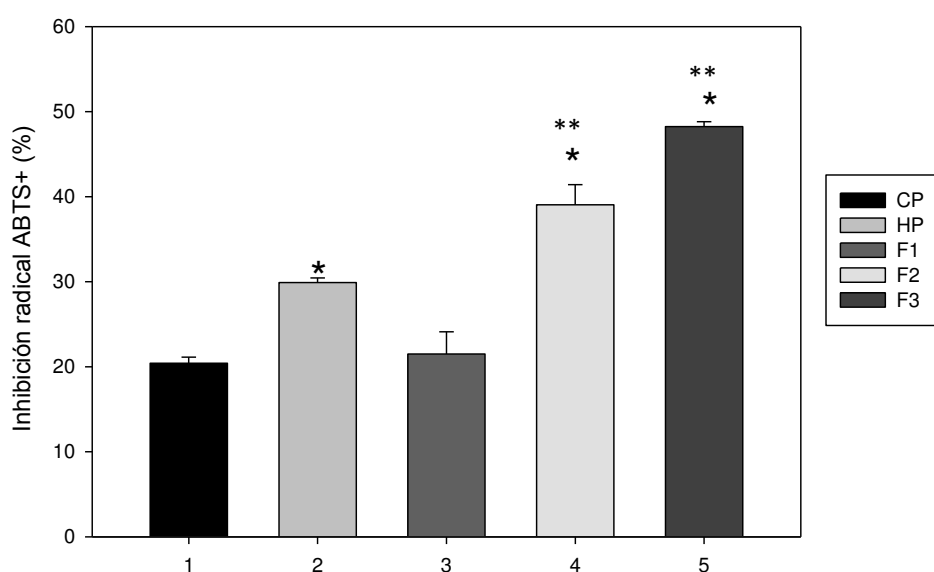


Figura 32. % Inhibición del radical ABTS+. 1. CP, 2. HP, 3. Fracción > 10kDa, 4. Fracción entre 3-10 kDa, 5. Fracción < 3kDa. * $p < 0.05$ vs CP; ** $p < 0.05$ vs HP (Test student-Newman-Keuls).

Esta misma fracción (F3) presentó un % de inhibición del catión ABTS+ 2.3 veces mayor con respecto al CP de pajuro de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Determinación de los valores TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$) por el método ABTS+

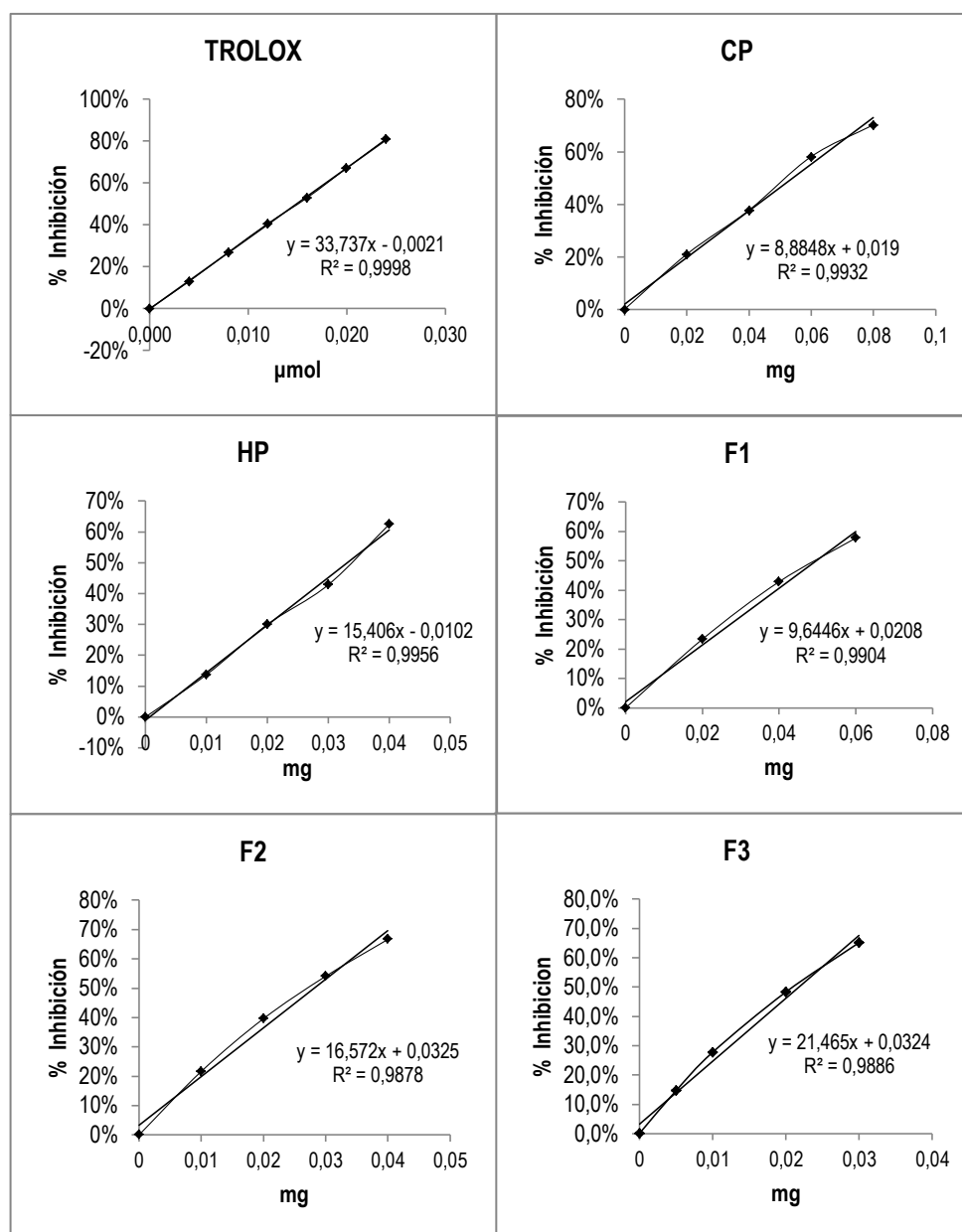


Figura 33. Porcentaje de inhibición del radical ABTS+ para el Trolox, CP, HP y sus fracciones (F1, F2 Y F3) versus la concentración para la determinación del valor TEAC.

En la Figura 33 se representa el porcentaje de inhibición versus concentración, obtenidos en cada uno de los ensayos a partir de los cuales se determinó las pendientes de la recta para cada caso. En el cálculo de la actividad antioxidante expresado en TEAC se usó la pendiente de la muestra (p) que se dividió entre la pendiente del Trolox, usado como estándar (p_{st}) y el valor resultante (p/p_{st}) correspondió al TEAC ($\mu\text{mol ET/mg}$). Los valores obtenidos se presentan en TEAC-ABTS ($\mu\text{mol ET/g}$) en la Tabla 11.

Tabla 11, Actividad antioxidante Equivalente a Trolox del Concentrado proteico de pajuro y sus ultrafiltrados.

Muestras	Pendiente	p/p_{st}	TEAC $\mu\text{mol ET/g}$
CP	8,884	0,2630	263,03
HP	15,406	0,4539	453,90
F1	9,644	0,2859	285,93
F2	16,572	0,4913	491,33
F3	21,465	0,6362	636,20
Trolox	33,737	-	-

En la Figura 34, se observa la actividad antioxidante alcanzada por las fracciones peptídicas obteniendo la mayor actividad la fracción F1, con TEAC de 636.2 $\mu\text{mol ET/g}$

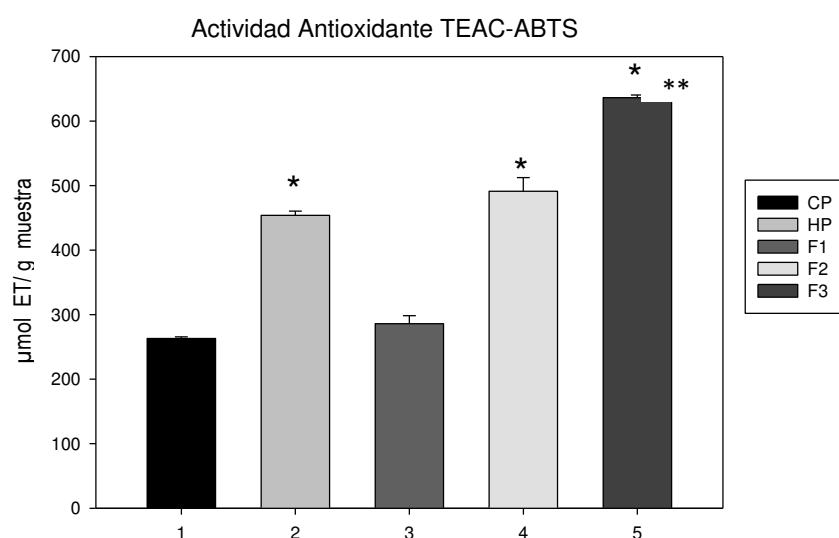


Figura 34, Actividad antioxidante equivalente Trolox (TEAC). 1. CP, 2. HP, 3. Fracción > 10kDa, 4. Fracción entre 3-10 kDa, 5. Fracción < 3kDa. * $p < 0.05$ vs CP; ** $p < 0.05$ vs HP (Test student-Newman-Keuls).

Determinación de VCEAC-ABTS.

Se procedió como para el TEAC-ABTS, determinando las pendientes de la curva de los gráficos de porcentaje de inhibición versus concentración (mg) de las muestras y del ácido ascórbico (Tabla 12).

Tabla 12, Determinación de la actividad antioxidante Equivalente a Vitamina "C" del CP de pajuro y de los ultrafiltrados.

Muestras	Pendiente	p/p _{st}	VCEAC (mg /g)
CP	8.884	0,0394	39.45
HP	15.406	0,0685	68.58
F1	9.644	0,0429	42.90
F2	16.572	0,0738	73.77
F3	21.465	0,0955	95.50
Vit. "C"	224.66	-	-

Los resultados se expresaron en valores VCEAC-ABTS que corresponden mg Equivalentes a la vitamina C/g muestra, tal como se aprecia en la Figura 35. Donde Los valores de VEAC-ABTS fueron aumentando al disminuir el tamaño molecular siendo más altos los que correspondieron a la fracción ultrafiltrada menor a 3 kDa,

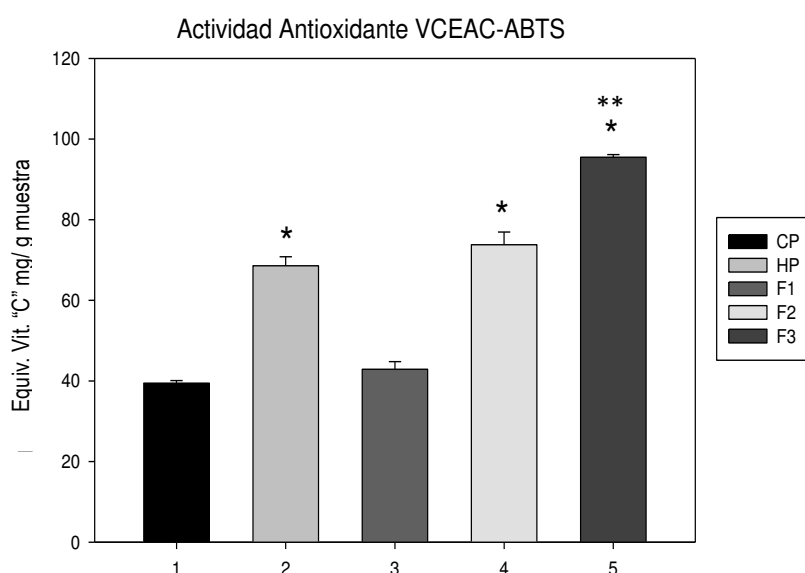


Figura 35, actividad antioxidante expresada en VEAC-ABTS. **1.** CP, **2.** HP, **3.** Fracción > 10kDa, **4.** Fracción entre 3-10 kDa, **5.** Fracción < 3kDa. *p<0.05 vs CP; ** p<0.05 vs HP (Test student-Newman-Keuls)

Determinación de los valores de IC₅₀ por el método ABTS+

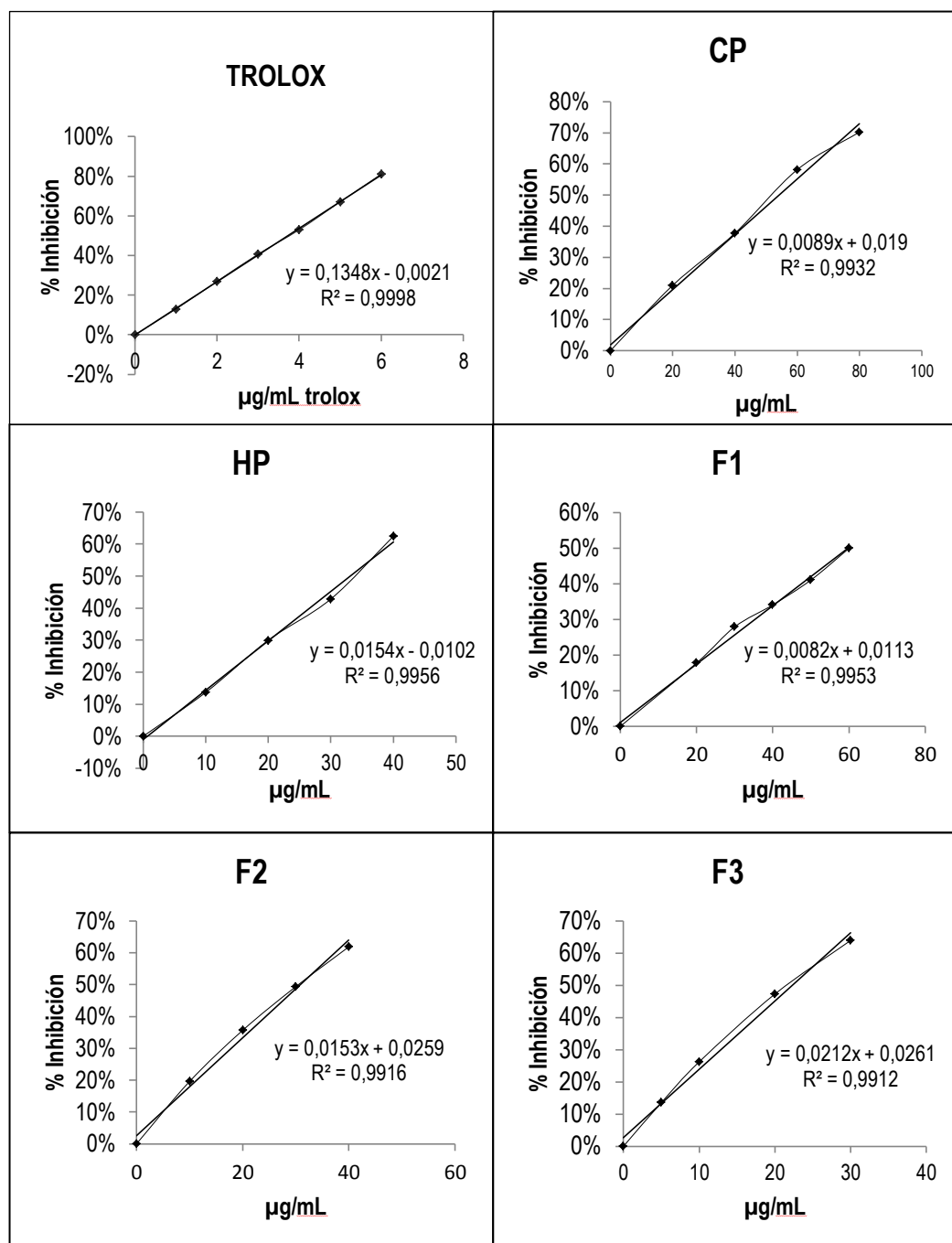


Figura 36. Porcentaje de inhibición del radical ABTS+ de Trolox, CP, HP y sus fracciones (F1, F2 Y F3) para la determinación del IC₅₀.

Para la determinación del valor IC_{50} , primero tenemos que recordar que esta es la concentración mínima para poder inhibir el 50% del radical ABTS+. La determinación del Valor del IC_{50} se realizó utilizando la ecuación de la recta ($y = mx + b$) hallada para cada muestra trabajada siguiendo la fórmula:

$$IC_{50} = \frac{0.5 - b}{m}$$

Dónde:

m : pendiente

b : Punto de intercepción

La figura 37. Presenta el valor de IC_{50} de las muestras ensayadas, teniendo en cuenta que a menor IC_{50} , mayor es la actividad antioxidante de la muestra. Donde el menor valor fue obtenido por la fracción F3 con $23,14 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$.

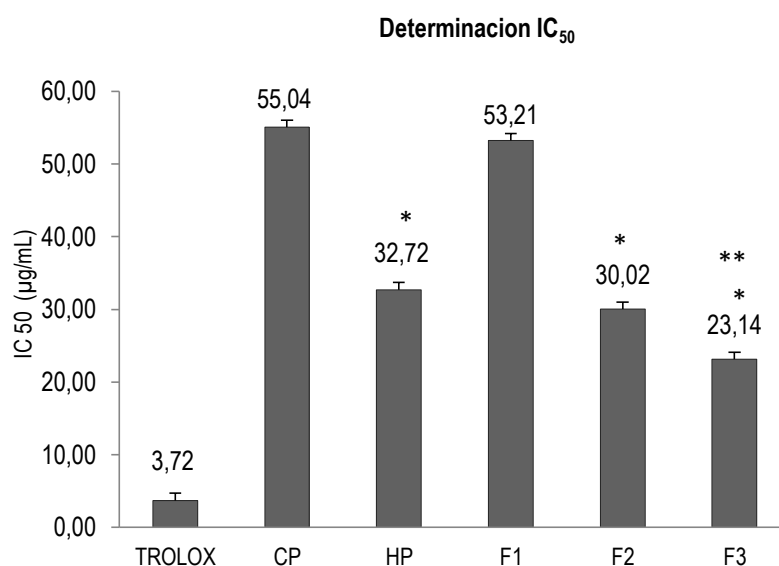


Figura 37. Representación gráfica de los valores IC_{50} obtenidos para el CP de pajujo y los ultrafiltrados, donde .CP, concentrado proteico, F1, F2 y F3, ultrafiltrados. * $p < 0.05$ vs CP; ** $p < 0.05$ vs HP (Test student-Newman-Keuls).

Método ORAC.

La Figura 38 muestra la curva de la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras por el método ORAC, la inhibición de la caída de la fluorescencia representa la mayor actividad antioxidante. Las muestras fueron trabajadas de acuerdo al diseño experimental obteniendo los valores de intensidad de fluorescencias.

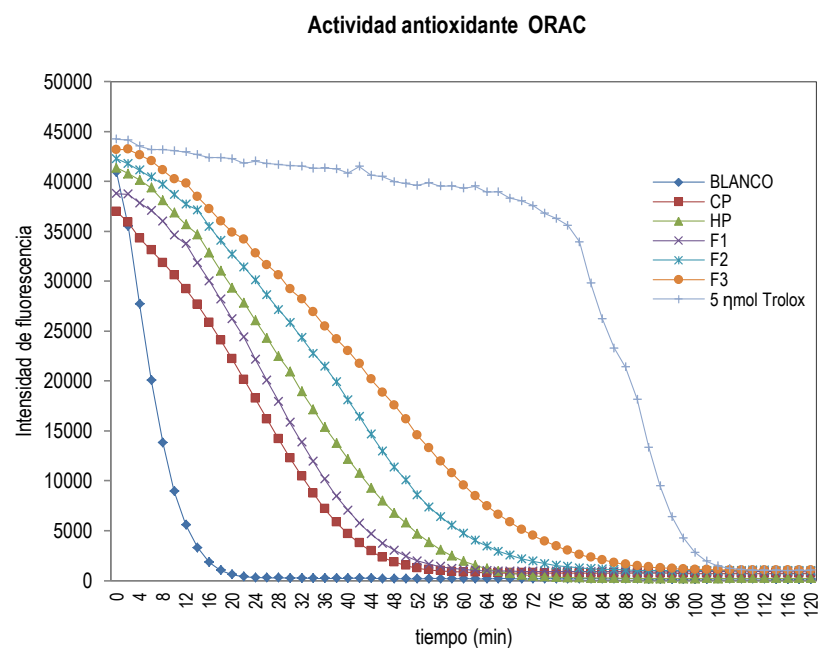
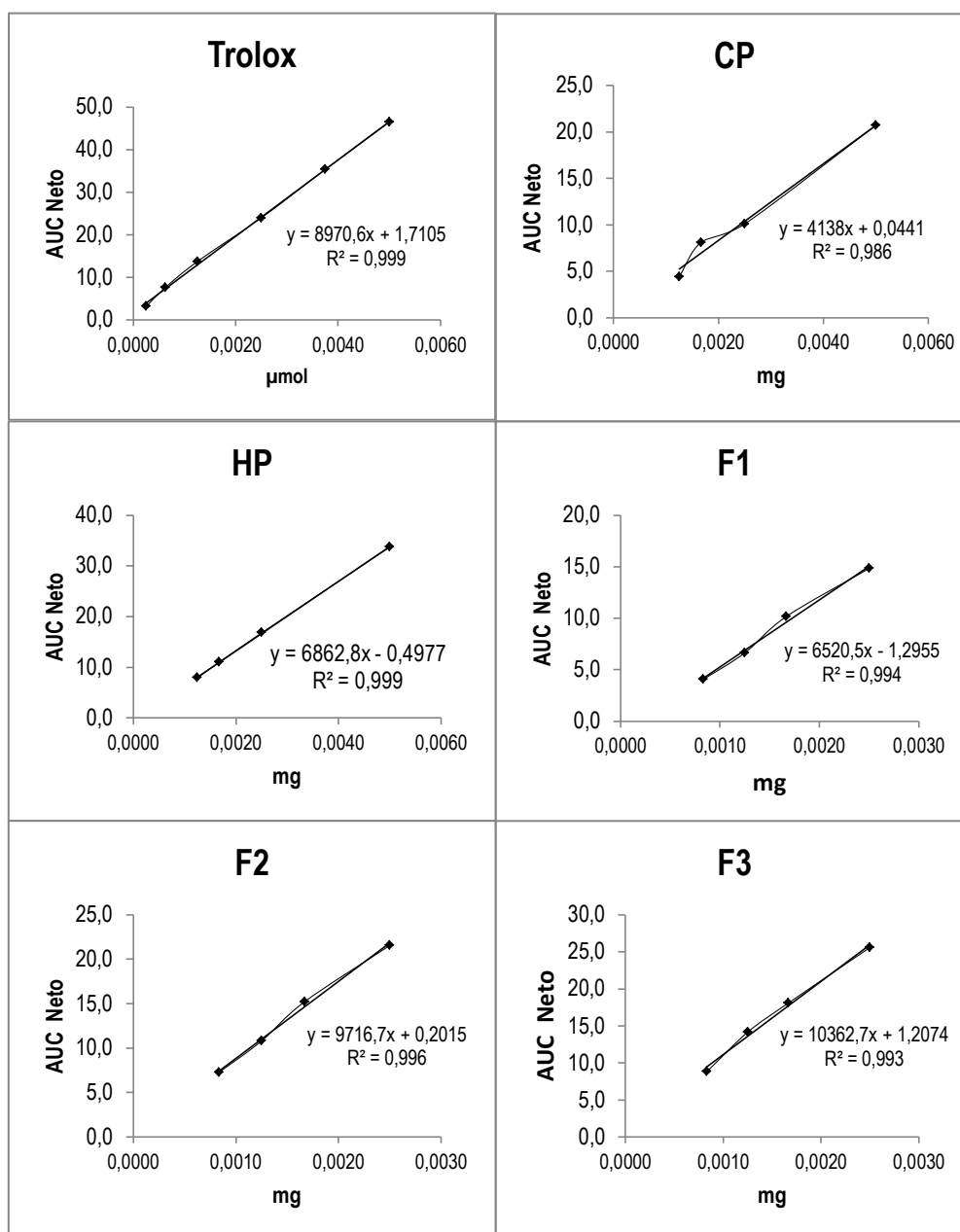


Figura 38. Actividad antioxidante mediante ORAC en muestras de CP, HP y fracciones F1, F2, F3 de pajuro

Determinación de la actividad antioxidante ORAC.



La Figura 39. Representa las curvas de ORAC para las muestras de pajuro a partir de las cuales se obtuvieron la pendiente de Trolox, CP, HP y sus fracciones para expresar la actividad antioxidante como TEAC (μmol ET/mg).

Se muestran en la Figura 39 los grafico de porcentaje de inhibición vs concentración obtenidos en cada uno de los ensayos a partir de los cuales se determinó las pendientes de la recta. Para poder realizar el cálculo de la actividad antioxidante expresado en TEAC la pendiente de la muestra se dividió entre la pendiente del Trolox, usado como estándar (p/p_{st}) y el valor resultante correspondió al TEAC ($\mu\text{mol ET/mg}$) Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Actividad antioxidante Equivalente a Trolox del CP, HP y sus fracciones.

Muestras	Pendiente	p/p_{st}	TEAC $\mu\text{mol ET/mg}$
CP	4138.0	0.461	0.461
HP	6862.8	0.770	0.770
F1	6520.5	0.726	0.726
F2	9716.7	1.063	1.063
F3	10362.7	1.176	1.176
Trolox	8970.6	-	-

La figura 40. Se representa la actividad antioxidante ORAC, observando una actividad en el CP de $0,461 \pm 0,011 \mu\text{mol ET/mg}$ y en la F3 un valor de $1,176 \pm 0,074 \mu\text{mol ET/mg}$, habiendo un incremento de 150% de dicha actividad en este último de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

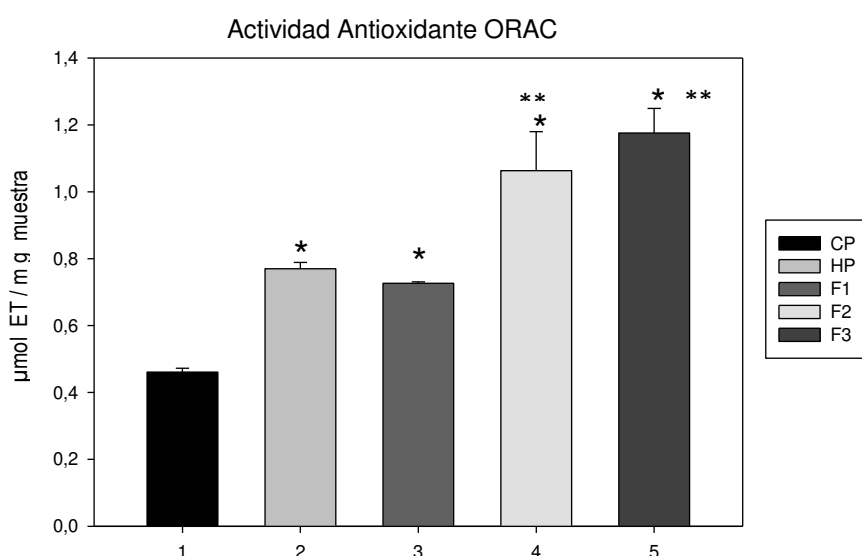


Figura 40. Actividad antioxidante ORAC. . 1. CP, 2. HP, 3. Fracción > 10kDa, 4. Fracción entre 3-10 kDa, 5. Fracción < 3kDa. * $p < 0.05$ vs CP; ** $p < 0.05$ vs HP (Test student-Newman-Keuls).

La tabla 14 resume la actividad antioxidante de las muestras ensayadas en el presente trabajo por los métodos ABTS y ORAC. En todos los casos, los valores que representan la mayor actividad antioxidante corresponden a la fracción F3, que contiene a los péptidos de menor tamaño molecular.

Muestra	ABTS			ORAC
	IC 50 ($\mu\text{g/mL}$)	TEAC ($\mu\text{mol ET/g}$)	VCEAC (mg Vit. "C"/g)	TEAC ($\mu\text{mol ET/mg}$)
CP	55.16 ± 1.42	$263.03 \pm 0,01$	39.45 ± 0.65	0.461 ± 0.011
HP	32.66 ± 1.49^a	$453.90 \pm 6,50^a$	68.58 ± 2.23^a	0.770 ± 0.018^a
F1	53.21 ± 2.56	$285.93 \pm 12,44$	42.90 ± 1.87	0.726 ± 0.004^a
F2	30.02 ± 2.62^a	$491.33 \pm 20,98^{a,b}$	73.77 ± 3.15^a	$1.063 \pm 0.117^{a,b}$
F3	$23.14 \pm 1.11^{a,b}$	$636.20 \pm 4.27^{a,b}$	$95.50 \pm 0.64^{a,b}$	$1.176 \pm 0.074^{a,b}$

^a $p < 0.05$ vs CP; ^b $p < 0.05$ vs HP (Test student-Newman-Keuls).

Tabla 14. Actividad antioxidante de las muestras ensayadas por los métodos ABTS y ORAC en el CP de pajuro y los ultrafiltrado

V. DISCUSIÓN

La búsqueda de péptidos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud usando como fuente, proteínas de origen vegetal no convencionales, es uno de los campos en la investigación que ha despertado gran interés. En esta ocasión, la biodiversidad del Perú nos ofrece un frejol sub utilizado, el pajuro (*Erythrina edulis*), que es la materia prima inicial para desarrollar la presente investigación.

Después de la limpieza y selección de la semilla, un parámetro importante a evaluar fue el rendimiento en la obtención de la harina que en nuestro caso fue de 27,18%, cuyo valor estuvo ligeramente por debajo de otras leguminosas como el tarwi ya que Borja reporta un 36% (75). Probablemente esto sea debido al alto contenido de agua (64,16%) que contenía el frejol fresco y, también se podría atribuir a que se tuvo pérdidas en la molienda y en el tamizado.

El pajuro, es una leguminosa que se usa en la alimentación en el norte del Perú y para conocer su composición nutrimental realizamos el análisis proximal de la harina resultado que se presente en la tabla N°10, donde se aprecia que el contenido de proteína inicial fue de 18,6%, lo cual está dentro de los valores que reportados por Pérez y col (76) quienes encontraron una variación del contenido proteico entre 18 - 21%. En tanto, la humedad fue de 10,17%, que es cercano con otro estudio, que reporta 8,37%(28). Respecto al contenido de grasas, que suelen ser unos interferentes en la extracción de proteínas, estas se presentaron en una mínima concentración de 1.31%, razón por la cual no se necesitó realizar un proceso de extracción de lípidos. El valor encontrado por nosotros fue relativamente menor al 2.50% reportado por Victor-Dumar y col (77) para la misma especie. En otras leguminosas como *Phaseolus lunatus* y *Cicer arietinum*, presentaron 2,62% y 1,42% según Colome y col (78) y Vioque y col (63) respectivamente. En cuanto al contenido de cenizas, fue muy similar al encontrado por Delgado y col (79) con un valor de 5.35 %.

Estas diferencias se pueden atribuir a muchos factores, tales como el método de extracción empleado, el contenido de humedad de la harina, las condiciones agronómicas del cultivo, el estado de maduración del mismo, entre otras (80).

Una etapa importante para la obtención de péptidos bioactivos es enriquecer la cantidad de proteína presente en la leguminosa, hasta obtener un concentrado rico en proteínas. Para nuestro caso, la obtención de concentrado proteico consistió en un proceso de extracción con una serie de etapas ya descritas anteriormente, que sirvieron para disminuir los componentes no proteicos (81). Las proteínas de origen vegetal son solubles a valores de pH próximos a 7, sin embargo se optó por extraerlas a un pH alcalino porque así se aprovechó su mayor solubilidad para luego precipitarlas en su punto isoeléctrico (82).

El contenido de proteína en la harina de pajuro fue de 18.6%, esta se incrementó significativamente en el CP obteniendo un 38.81%, logrando así concentrar 2.1 veces el contenido de proteína inicial, el cual fue mayor al recuperado por Cruz-Cervera y col (83) en harina de *Mucucuna pruriens* que logro concentrar 1.72 veces el contenido de proteína de 29.14% en la harina a 50.33% en el concentrado proteico, pero menor al reportado por Torruco (35) que concentró 2.76 y 2.38 veces la proteína de *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* de 26.0 y 26.8% de proteína en la harina a 71.8 y 63.8% de proteína en el concentrado proteico respectivamente, todas bajo el mismo método de Betancur y col (2004).

Así mismo al concentrado proteico, se evaluó la calidad de las proteínas obtenidas mediante electroforesis SDS-PAGE al 10%, donde se observaron muchas bandas, siendo cuatro de ellas muy bien definidas con tamaños de aproximadamente 55, 25, 20 y 18 kDa.

La hidrólisis enzimática se ha usado para modificar las propiedades funcionales y nutricionales de la proteína alimentaria dando como resultado péptidos de menor tamaño, más solubles, menos alergénicos y sobre todo con diversas acciones farmacológicas que requieren ser evaluadas. La calidad de los péptidos producidos es consecuencia del tipo de enzima utilizada para dicho proceso, de las condiciones del ensayo (relación E/S, pH, temperatura, tiempo de incubación) y de la fuente proteica (animal, vegetal, fermentación con microorganismos) (84).

En pruebas preliminares realizamos la hidrólisis del CP de pajuro empleando tres enzimas comerciales de grado alimentario y con características distintas: Alcalasa, Flavorzima y Neutrasa, obteniendo mejores resultados con la primera (Anexo 3), motivo por el cual se eligió para este trabajo. Un primer indicador de la ruptura de los enlaces peptídicos se evidenció por la disminución de la concentración proteica inicial de 12.91 a 0.43 mg/mL, (Figura 47). También se observó la desaparición significativa de las principales bandas del CP, quedando visiblemente una sola banda poco pronunciada, y la presencia de una banda menor a 10 kDa en la parte inferior del gel trabajado (Figura 29).

Cabe mencionar que el GH es una medida de la magnitud de la degradación hidrolítica de una proteína (55) (85). El GH empleando la alcalasa, tuvo un rápido incremento en el punto inicial y una posterior fase estacionaria, esto puede deberse a la reducción del número de enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis, a la inhibición de la enzima por los productos y/o sustratos o la inactivación de la enzima (86). Este valor se incrementa conforme aumenta el tiempo de hidrólisis, es así, que en nuestro caso fueron: 15.37, 28.49, 39,60 y 44,60% en los tiempos de 15, 30, 60 y 120 minutos, respectivamente.

El %GH que se alcanzó a los 120 minutos fue mayor al 19,50% reportado por Cruz-Cervera y col (83) a los 90 minutos para el hidrolizado de *Mucucuna pruriens*. Así mismo, Torruco (35) hidrolizando las leguminosas *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus vulgaris* obtuvieron un 37.94% y 49,48% a los tiempos de 45 y 30 min respectivamente, valores que resultan cercano a los nuestros. Esto sería debido a las diferencias en la estructura primaria de las proteínas usadas como sustrato ya que ofrecen diferentes puntos de corte para la Alcalasa y a las condiciones empleadas en el ensayo.

Según la literatura, son los péptidos de bajo peso molecular a los que se les atribuye muchos usos terapéuticos, entre ellos la actividad antioxidante (84). En esa dirección, nuestro hidrolizado proteico con mayor GH fue sometido al proceso de ultrafiltración para reducir el tamaño de los péptidos, obteniendo tres fracciones según el tamaño de corte de la membrana: >10kDa, 3-10kDa y <3kDa las cuales se denominó F1, F2 Y F3 respectivamente.

Es conocido que los péptidos antioxidantes, pueden limitar el daño oxidativo, tanto en alimentos preparados (usándolos como antioxidantes naturales), así como al proteger de la oxidación a las células del organismo cuando éstos sean ingeridos en la dieta (87). De allí nuestro interés en evaluar la actividad antioxidante de las fracciones permeadas por ultrafiltración. Dicha actividad de los péptidos bioactivos puede ser atribuida a su capacidad para la eliminación de radicales, la inhibición de la peroxidación lipídica y a las propiedades quelantes de iones metálicos (88).

Existen diversos métodos *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante de un extracto y/o alimento, entre los que mencionaremos al DPPH, ABTS, FRAP, ORAC cuyos resultados se expresan en valores TEAC, VCEAC, porcentaje de inhibición, IC₅₀, por mencionar algunos.

Cuando determinamos la actividad antioxidante por el método ABTS, el HP de pajuro tuvo un valor de $453.90 \pm 6.50 \mu\text{mol ET/g}$, mayor al reportado por Medrano et al (11) con $260 \mu\text{mol ET/g}$ para el hidrolizado de soya. Al comparar la fracción F3 ($636.20 \pm 4.27 \mu\text{mol ET/g}$) con el CP ($263.03 \pm 2.54 \mu\text{mol ET/g}$) resultó que la primera tuvo una actividad antioxidante TEAC-ABTS mayor estadísticamente significativa ($p < 0.05$) casi tres veces mayor al inicial.

Referente a la actividad antioxidante equivalente a la Vitamina C, la fracción F3 tuvo un VCEAC-ABTS de $95.50 \pm 0.64 \text{ mg /g}$ el cual fue mayor que las otras fracciones F2 y F1 (73.77 ± 3.14 y $42.90 \pm 1.87 \text{ mg /g}$ respectivamente). Mosquera (89) reporta en la fracción peptídica menor a 3 kDa obtenido del hidrolizado de *Sparus aurata* una actividad de $27.73 \pm 0.5 \text{ mg VCEAC/g}$ de proteína, en nuestro estudio dicha actividad fue 2.5 veces mayor para la misma fracción de forma estadísticamente significativa.

Otra forma de expresar la actividad antioxidante es determinando la concentración requerida para alcanzar el 50 % de inhibición del radical libre ABTS⁺ que corresponde al IC₅₀. Para el caso de los ultrafiltrados F1, F2 y F3 obtenidos a partir del hidrolizado de pajuro, los valores de IC₅₀ fueron $53.21 \mu\text{g/mL} > 30.02 \mu\text{g/mL} > 23.14 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, es decir hubo un aumento de la actividad antioxidante conforme disminuía el tamaño de los péptidos. Las fracciones F2 y F3 al tener IC₅₀ iguales o menores a $30 \mu\text{g/mL}$ se les puede considerar como buenos candidatos a péptidos antioxidantes según la clasificación de Ramos, A. y col (2003)(90) quienes consideran de alto potencial antioxidante a aquellos compuestos con un IC₅₀ menores a 30 mg/mL .

A diferencia de la medida de la capacidad antioxidante empleando el radical ABTS, el método ORAC se aplica con frecuencia para determinar la capacidad antioxidante en muestras biológicas y alimentos. Así mismo, presenta una gran ventaja ya que el ensayo combina tiempo y disminución de la inhibición, a diferencia de otros métodos

convencionales (ABTS+, DPPH, FRAP) que únicamente evalúa la disminución en la inhibición.

La actividad antioxidante ORAC equivalente al Trolox encontrada para las fracciones permeadas presentaron la misma tendencia que con el método ABTS, es decir la menor actividad antioxidante correspondió a la fracción F1 con $0,726 \pm 0,004 \mu\text{Mol ET/mg}$ y la mayor estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a la F3 con $1,176 \pm 0,074 \mu\text{mol ET/mg}$ la cual fue. Este valor fue similar al encontrado por De Souza y col (91) para *P. vulgaris* con Alcalasa obteniendo una actividad equivalente a $1,085 \mu\text{mol TE/mg}$ de proteína,

Cabe destacar que el pajuro es una fuente de proteína no convencional, sin embargo la actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática y ultrafiltración presentan valores similares o mejores a los encontrados en fuentes de proteínas de alto valor biológico como el huevo. Chay Pak Ting, BP (92) reportó una actividad antioxidante para fracciones peptídicas de yema de huevo hidrolizadas con Alcalasa de tamaños $<5 \text{ kDa}$ y $< 1 \text{ kDa}$, valores de 0.720 y $0.867 \mu\text{mol ET/mg}$, respectivamente. De igual manera, nuestro resultado para F3 está dentro del rango que reporta Hernández-Ledesma y col. (93) para las fracciones $<3\text{kDa}$ de hidrolizados de *b*-lactoglobulina con tripsina y corolase PP (0.667 ± 0.012 a $1.897 \pm 0.019 \mu\text{mol ET/mg}$ respectivamente) .Así mismo fue superior a la determinada por Pérez-Vega et al. (94) en la fracción $<3 \text{ kDa}$ de hidrolizado de *Isostichopus badionotus* con pepsina con $0.61 \pm 0.02 \mu\text{mol ET/mg}$ pero menor a la del sistema secuencial con pepsina-corolase ($4.40 \pm 0.09 \mu\text{mol ET/mg}$).

Según los resultados presentados en este estudio podemos decir que la fracción menor a 3 kDa de la proteína de pajuro presentó la mayor capacidad antioxidante con el método del ABTS y ORAC (Tabla 14), y ésta fue inversamente proporcional al tamaño de la fracción peptídica evaluada. Los resultados obtenidos son coherentes con la literatura científica que describe que la mayoría de los péptidos antioxidantes

derivados de fuentes alimentarias presentan intervalos de peso molecular de 500 a 1800 Da. Como en nuestro caso la fracción peptídica < 3kDa presento mayor actividad antioxidante que la fracción entre 3-10 kDa y la > 10 kDa.

Estudios epidemiológicos destacan la importancia de los antioxidantes naturales en especial en la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares (89). Otra información que se conoce es que la mayor actividad de los péptidos comparada con los aminoácidos libres se debe a las propiedades fisicoquímicas únicas conferidas por sus secuencias de aminoácidos. Es así que se han realizado investigaciones que han demostrado que algunos aminoácidos presentes en los péptidos tales como, His, Trp, Tyr y Lys, tienen propiedades antioxidantes. Por otra parte, los aminoácidos básicos pueden quelar iones metálicos, y la Cys, gracias a su grupo tiólico, es un donador de protones. Se ha demostrado recientemente que Val y Leu ejercen propiedades antioxidantes cuando se encuentran en el extremo N-terminal de un péptido y que Tyr y Trp si están en la secuencia C-terminal.

Este es un camino que esperamos seguir con futuras investigaciones que nos lleven a purificar el péptido menor de 3 kDa con mayor actividad antioxidantes que hemos obtenido a partir del hidrolizado del concentrado proteico de pajuro, determinar su secuencia y evaluar su aplicación en la industria farmacéutica y/o alimentaria.

VI. CONCLUSIONES

- La extracción de las proteínas solubles a partir de las semillas de *Erythrina edulis* se realizó mediante el método de precipitación a pH diferencial. El concentrado proteico se separó usando la electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, se logró visualizar un perfil electroforético caracterizado por la presencia de diez bandas íntegras, siendo las más abundantes las correspondientes a los tamaños de 55, 25, 20 y 18 kDa, aproximadamente.
- El concentrado proteico de pajuro se hidrolizó con la enzima comercial Alcalasa 2,4UA/g, las condiciones óptimas de actividad enzimática se alcanzaron utilizando 4% (p/v) de sustrato, relación E/S 1/200, pH 8.3, temperatura 50 °C; obteniendo el mayor porcentaje de grado de hidrolisis (44,6%) a los 120 min de digestión.
- El hidrolizado proteico con mayor grado de hidrolisis se fraccionó mediante ultrafiltración molécula utilizando membranas de 10 y 3 kDa de forma secuencial, obteniendo tres fracciones peptídicas F1, F2 y F3 de tamaños: >10kDa, 3-10kDa y <3kDa., respectivamente.
- En las diferentes fracciones peptídicas F1 F2 y F3 se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos ABTS y ORAC, utilizando como controles el concentrado proteico sin hidrolizar y el hidrolizado proteico sin fraccionar y como estándares de referencia Vitamina C y Trolox, los resultados fueron expresados como TEAC y VCEAC.

- La actividad antioxidante TEAC- ABTS, para las fracciones peptídicas permeadas F1, F2 Y F3, fueron: 285.93 ± 12.44 ; $491,33 \pm 20.98$ y $636,20 \pm 4.27$ $\mu\text{mol ET/g}$, con valores de IC50 de 53.21 ± 2.56 ; 30.02 ± 2.62 y 23.14 ± 1.11 $\mu\text{g/mL}$. respectivamente. La actividad antioxidante determinada por el método ORAC presentó valores de 0.726 ± 0.004 ; 1.063 ± 0.117 y 1.176 ± 0.074 $\mu\text{mol ET/mg}$, para las fracciones peptídicas F1, F2 Y F3 respectivamente.
- El fraccionamiento molecular permitió separar la fracción peptídica < 3 kDa, la cual presentó un incremento de la actividad antioxidante en más de 150% respecto al concentrado proteico sin hidrolizar de forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$), evidenciando el buen perfil antioxidante, por tanto se podría utilizar como una buena fuente para la obtención de péptidos bioactivos con potencial nutracéutico.

VII. RECOMENDACIONES

- Optimizar los rendimientos de extracción de las proteínas de la harina de *Erythrina edulis* estudiando relación harina: solvente, tiempo de hidratación, temperatura de extracción, etc.
- Hidrolizar con sistemas secuenciales simulando el sistema gastrointestinal mediante el empleo de pepsina y pancreatina, para evaluar la biodisponibilidad de los péptidos obtenidos.
- Purificar el péptido obtenido (< 3 kDa) mediante técnicas cromatográficas y evaluar su actividad antioxidante.
- Determinar la composición aminoacídica de los péptidos obtenidos con actividad antioxidante.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Escamilo S. Pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. Investigaciones Sociales UNMSM. 2012; 16 (28): 16-20.
2. Peñas E, Frias J, Gomez R. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. FOOD Chem.2015;171:224–32.
3. Carlos J, Ruiz R, Abram D, Ancona B, Rubi M, Campos S. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering ; Nutraceutical potential. 2014;29(4):776–84.
4. Cheng Y, Xiong YL, Chen J. Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. Food Chem 2010;120(1):101–8.
5. Hsieh C, Lumen BO De, Herna B. Peptides Lunasin , a novel seed peptide for cancer prevention. 2009;30:426–30.
6. Chel-Guerrero L, Gallegos-Tintore S, Martinez-Ayala A, Castellanos-Ruelas A, Betancur-Ancona D. Functional properties of proteins from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. Food Sci Technol Int. United States; 2011 Apr;17(2):119–26.
7. Orona-Tamayo D, Valverde ME, Nieto-Rendón B, Paredes-López O. Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. LWT - Food Sci Technol. 2015;64(1):236–42.
8. Souza T, Real-Hernandez LM, Chang YK, González de Mejía E. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. Food Research International. 2014; 64(1):799–809.
9. Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J Funct Foods.;2011;3(4):229–54.
10. Manninen AH. Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. J Sports Sci Med. Turkey; 2004 Jun;3(2):60–63.
11. Medrano A., Del Castillo MD. Obtención de péptidos antioxidantes de glicinina de soja. Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay . (2011) No. 6: 32-36.

12. Comfort F. Ajibola, Joseph B. Fashakin, Tayo N. Fagbemi and Rotimi E. Aluko. Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12, 6685-6702.
13. Contreras MM, Hernández-Ledesma B, Amigo L, Pedro J. Martín-Álvarez, Isidra Recio. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2011; 44(1); 9-15.
14. Valdez-Ortiz A, Cindy I. Fuentes-Gutiérrez, Lourdes J. Germán-Báez, Gutiérrez-Dorado R, Medina-Godoy S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*. 2012; 46: 91-96.
15. Karaś M, Jakubczyk A, Szymanowska U, Materska M, Zielińska E. Antioxidant activity of protein hydrolysates from raw and heat-treated yellow string beans (*phaseolus vulgaris* l. *tecnología de los alimentos*. 2014; 13(4): 385-391.
16. Folmer AP, Joner Daroit D, Fontouraa R, Meister SM, Segalina J, Brandelli A. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*. 2014; 61: 48–55.
17. Mokni A, Sila A, Przybylski R, Nedjar-Arroume N, Makhoul I, Blecker C, Hamadi A, Dhulster P, Bougatef A, Besbes S. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. *journal of functional foods*. 2015; 12: 516–525.
18. Torres-Fuentes C, Contreras MM, Recio I, Alaiz M, Vioque J. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 2015; 180: 194–202.
19. Liu J, Jin Y, Lin S, Gregory S. Jones, Feng Chen. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2015; 175: 258–266.
20. Qiao-Juan Y, Lin-Hua H, Qian S, Zheng-Qiang J, Xia Wu. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chemistry* 179 (2015) 290–295.
21. Garcia-Mora P, Frias J, Peñas E, Zieliński H, Giménez-Bastida JA, Wiczowski W, et al. Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.var. pinto) proteins by subtilisins. *J Funct Foods*. 2015;18:319–332.

22. Gutteridge R. & Shelton H. Forage tree legumes in tropical agriculture. The Tropical Grassland Society of Australia Inc. 1999.
23. Araujo V.A. Estudio taxonómico de seis especies del género *Erythrina* L. (Fabaceae). [Tesis de Maestría]: Lima. Facultad de ciencias biológicas. UNMSM. Perú. 2005.
24. Antúnez de Mayolo S.E. *La nutrición en el antiguo Perú*. Lima, Banco Central de Reservas del Perú. 1981.
25. Triana ex M. *Erythrina edulis*, poroto, chachafruto. Agroforestry Database 4.0. 2009:1-5.
26. Lojan I. El verdor de los andes. Proyecto de desarrollo forestal participativo de los Andes. Quito – Ecuador 1992; 217.
27. Acero L. Guía para el cultivo y aprovechamiento del chachafruto o balú: *Erythrina edulis* Triana ex Micheli. 2a ed. corr. y aum. Bogotá. 2002., Convenio Andrés Bello, p.18-26.
28. Arango B., Bolaños P., Ricaurte G., Caicedo, M., Guerrero, Y. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). Rev Univ. Salud 2012; 14(2): 1-8.
29. García NP. Propagación vegetativa del Porotón "*Erythrina edulis*" utilizando tres procedencias, tres diámetros de estaca con y sin hormonas en la granja experimental "la pradera" provincia de Imbabura. [Tesis de grado]. Ibarra – Ecuador Universidad técnica del norte Ciencias agropecuarias y ambientales. 2008.
30. Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. Int Dairy Journal. 1998;8:363-73.
31. Shahidi A, Zhong B. Bioactive peptides. Jour Aoac Int. 2008;91:914-31.
32. Robert PR, Zaloga GP. Dietary bioactive peptides. New Horizons. 1994; 2:237-243.
33. Iwaniak A & Minkiewicz P. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. Acta Scientiarum. Polonorum Technology Alimentary. (2007), Vol.6 (3), 5-15.
34. Quirós A. Leches Fermentadas con Actividad Antihipertensiva: Identificación de Péptidos y Evaluación de su Biodisponibilidad. [tesis doctoral] Madrid: Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid. (2007).

35. Torruco-Uco J. Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frejol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol Jnampa (*Phaseolus vulgaris*). [Tesis Doctotal]. Mexico D.F. Escuela Nacional de ciencia biologicas, Instituto Politecnica Nacional.2009.
36. Kleinrt H, Schwarz PM, and Forstermann U. regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Biol. chem. 2003; 384: 1343-64.
37. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. Biochim Biophys Acta. 1999; 1462(1-2): 71–87.
38. Manten E. Formula infantiles hipoalergenicas con alto grado de hidrolisis proteica y elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturadas de cadena larga para la prevención terciaria de lactantes con alergias a las proteínas de la leche de vaca. [tesis doctoral]. España, Universidad de Murcia 2013.
39. Biziulevicius GA, Kislukhina OV, Kazlauskaite J, Zukaite V. Food-protein enzymatic chydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a “cause and effect” theory of bifunctionality. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 46(1): 31-8.
40. Preza y Lerma A. Obtención de péptidos bioactivos mediante hidrolisis enzimática de proteínas de reserva en la semilla de cacao. [tesis doctoral]. México D.F, sección de estudio de posgrado e investigación, Instituto politécnico nacional. 2010.
41. De Mejia E & De lumen, B.O. Soybean bioactive peptides a new horizon in preventing chronic diseases. Sex. Rep. Menopause 2006. 4(2), 91-95.
42. Vioque J, Millán F. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. CTC Alimentación, 26, 2005.pag 103-107.
43. Liu JR., Chen MJ, & Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. Journal of agricultural and Food chemistry, 2005. 53:2467-2474.
44. Hernández B, Dávalos A, Bartolomé B. y Lourdes Amigo. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from-Lactalbumin and â-Lactoglobulina. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:588-593.
45. Wang, W., & Gonzales de Mejia, E. A new frotier in soy bioactive peptides that may preventage – related chronic diseases. Compr. Rev. Food Sci. 2005, 4, 63-76.
46. Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Res Int. 2003:949–957.

47. Torruco-Uco JG, Domínguez-Magaña MA, Dávila-Ortíz G, Martínez-Ayala A, Chel-Guerrero LA., Betancur-Ancona DA. Péptidos Antihipertensivos, Una Alternativa de Tratamiento de Origen. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2008; 6(2): 158-168.
48. Hartmann R. y Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Food Biotechnology*. 2007; 18: 163-169.
49. Martínez AO, Martínez de Victoria E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* 2006; 21: 1-14.
50. Benítez R., Ibarz A., Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones *Acta Bioquím. Clín. Latinoam* 2008; 42 (2): 227-36.
51. Whitaker JR. Principles of enzymology for the food science 2nd. Ed. New York: Marcel Dekker; 1994.
52. Vioque J, Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Megías C, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F. Peptídeos Bioativo sem Proteínas Vegetais de Reserva. *Brazilian Journal of Food Technology III JIPCA*, 2006. 99-102.
53. Doucet D, Otter DE, Gauthier SF, Foegeding EA. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric. Food. Chem.* 2003;51 (21):6300–6308.
54. Penta EA., Xiong YL. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J Food Sci.* 2002; 67(8):2952–2956.
55. Pedroche J, Yust MM, Giron-Calle J, Alaiz M, Milla F y Vioque J. Utilization of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-Inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agricultura.* 2002; 82: 960-965.
56. Korhonen H. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal OF Dairy technology* 2002. 55(2); 79-88.
57. Vioque J, Millán F. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.* 2006; 103–107.
58. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas.* 2005, 25(4): 726-732.

59. Ugartondo V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Facultad de farmacia . Universidad de Barcelona. 2009.
60. Ojha H, Mishra K, Chaudhury N K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry. Feb 2012; 130: 1036-1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
61. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. 1995; 20: 25-30.
62. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agr. Food Chem. 2001; 49:4619-26.
63. Vioque, J., Sánchez, R., Pedroche, J., Yust, M., & Millán, F. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. Grasas y Aceites. 2001; 52(2); 127-131.
64. Betancur, D., Gallegos, S., & Chel, L. Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004; 84: 1193-1201.
65. Chel, L., Pérez, V., Betancur, D., & Dávila, G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002; 50(3): 584-591.
66. Guadix A., Guadix, E., Paez, M., Gonzales, P., Camacho, P. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Arspharmaceutica. 2000; 41(1): 79-89.
67. Nielsen, P.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. En: Journal of Food Science. 2001, 66:642-646.
68. García HM. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG. 2000; 1(2) :31-41.
69. Laemmli. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature .1970; 227: 680 – 685.
70. Voet D & Voet J .Bioquímica. Capítulo 5: Técnicas de purificación de las proteínas. pp.: 79-113. Ediciones Omega . Barcelona. España. (1992)
71. Riquelme-Gyimesy LF. Desarrollo por ultrafiltración de un concentrado proteico a partir de lactosuero. Instituto de ciencia y tecnología de alimentos. Medellín [Tesis de maestría] Universidad Nacional de Colombia.2010.

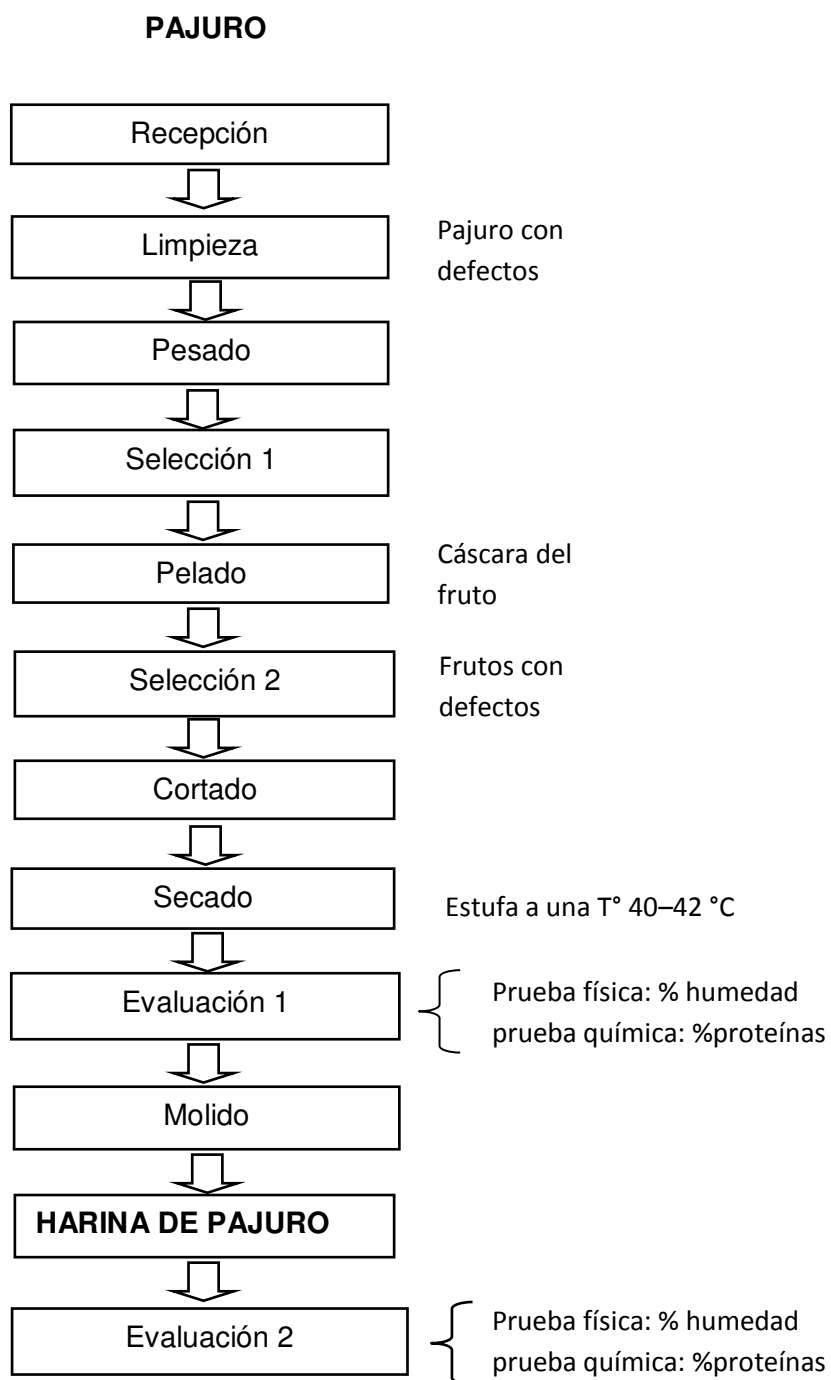
72. RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999; 26(9-10); 1231-1237.
73. Cornucopia C. Caracterización y evaluación funcional y de seguridad de compuestos bioactivos de frutas iberoamericanas como ingredientes alimentarios. 2012: 1-6.
74. Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 48-54.
75. Borja, J. Obtención de Péptidos Bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") Mediante Proteasas de *Bacillus sp.* [tesis de grado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. 2014.
76. Pérez, G.; Martínez, C.; Díaz, E. Evaluation of the protein quality of *Erythrina edulis* (balú). Arch Latinoam Nutr. 1979; 29(2), 193-207.
77. Quintero VD, Lucas JC y Álzate EN. Determinación de las propiedades térmicas y composicionales de la harina y almidón de chachafruto. Revista de la Facultad de Ingeniería, 2013:16-32.
78. Colome C, Bilbao T, Ledesma L y Zumarraga. Evaluación preliminar de algunos tóxicos naturales en leguminosas de mayor consumo en el estado de Yucatán. Tecnología de alimentos. 1993; 28; 8-13.
79. Delgado N., Albarracín W. Microstructure and functional properties of chachafruto (*Erythrina edulis*) and quinoa (*Chenopodium quinoa* w) flours: potential meat extenders. Tecnología de alimentos Colombia. 2014; 2;32-45.
80. Barrera N. Origen e historia del chachafruto en Colombia. *Erythrina edulis* Triana ex Micheli. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 2002: 1
81. Luna A,. Composición y procesamiento de la soya para consumo humano, Investigación científica, Universidad autónoma de aguas calientes, México. 2007;15:35-44.
82. Scopes, K. 1994, Protein Purification, Principles and practice, Springer advanced, tercera edición, New York, Heidelberg, Berlín pp.70-72.
83. Cruz-Cervera, G. Castellanos-Ruelas, A., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero. Capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de la proteína de frijol terciopelo *Mucuna pruriens*., Revista de la Facultad de Ingeniería Química. 2010; 50: 17-24.

84. Mahmoud, M. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. Food Technology. 1994: 89-113.
85. Nilsang, S.; Lertsiri, S.; Supphantharika, M.; Assavanig, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. 2005: 70; 571-578.
86. Jung S.; Roussel-Philippe C.; Briggs J.; Murphy P.; Johnson L. Limited Hydrolysis of Soy Proteins with Endo- and Exoproteases. Journal of American OilChemists' Society. 2004; 81: 953-960.
87. Gallegos-Tintoré, S., Torres-Fuentes, C., Martínez-Ayala, A.L., Solorza-Feria, J., Alaiz, M., Girón Calle, J., & Vioque, J. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. proteína hydrolysates. J Sci Food Agric. 2011; 91; 1618-1624.
88. samaranayaka, A.G.P., & Li-chan, E. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. J funcfood, 2011; 3(4); 229-234.
89. Mosquera M. Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, España. 2014.
90. Ramos MLG, Gordon AJ, Minchin FR, Sprent JI, Parsons R. Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann Bot (Lond). 1999: 83, 57–63.
91. De Souza T, Real L.M., Mojica L., Johnson MH, Chang, KY. , González de Mejia E. Germination of *Phaseolus vulgaris* and alcalase hydrolysis of its proteins produced bioactive peptides capable of improving markers related to type-2 diabetes in vitro. Food Research International 76 2015: 150–159.
92. Chay Pak Ting, BP., Mine, Y., Juneja, L.R., Okubo, T. , Gauthier, SF and Pouliot, Y. Comparative Composition and Antioxidant Activity of Peptide Fractions Obtained by Ultrafiltration of Egg Yolk Protein Enzymatic Hydrolysates *Membranes*. 2011; 1: 149-161.
93. Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B. y Lourdes Amigo. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 588-593.
94. Pérez-Vega J., Ra-Castillo L., Gómez-Ruiz J.B, Hernández-Ledesma B. Release of multifunctional peptides by gastro intestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). Journal of Functional Foods. 2013; 5; 869–877.

IX. ANEXOS

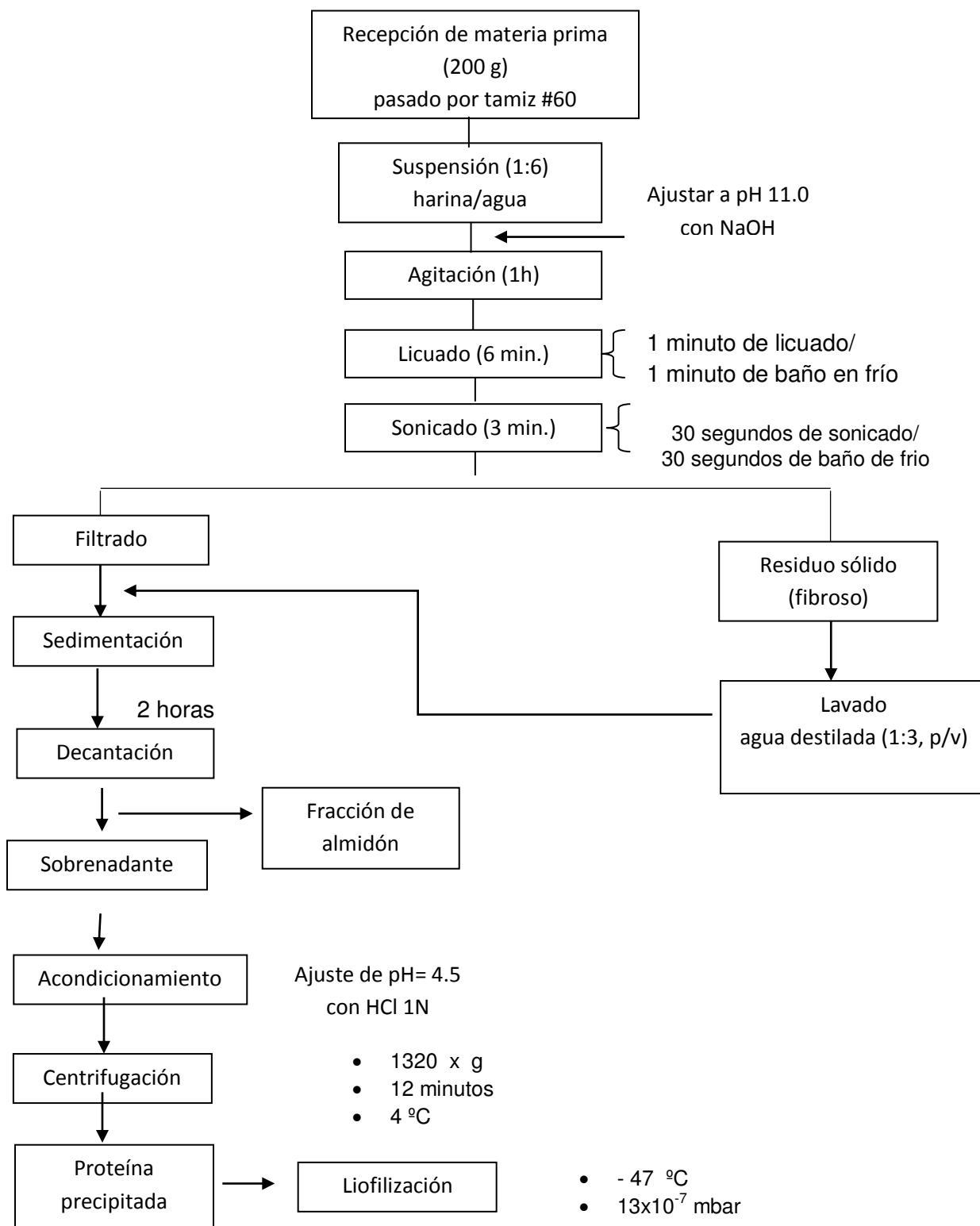
ANEXO N°1

Anexo N° 1: Diagrama de operación para la obtención de concentrado proteico de harina de pajuro



ANEXO N°2

Diagrama de operación para la obtención de concentrado proteico de harina de pajuro



ANEXO N°3



XVI Congreso Nacional de
Biotecnología y Bioingeniería

21 al 26 de Junio de 2015 Guadalajara, Jalisco, México.

Guadalajara

OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE PAJURO (*Erythrina edulis*) CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.

¹Arturo Intiquilla Quispe, ¹Karim Jiménez Aliaga, ¹Carmen Peña Suasnábar, ¹Elizabeth Chávez, ¹Inés Arnao, ²Bianca Hernández-Ledesma, ¹Amparo Zavaleta.

¹Laboratorio de biología molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ca. Germán Amezaga #375 Lima, Perú. Teléfono: +51 (01) 956372501, +51 (01) 977141802.

Correo electrónico: arturointi.unmsm@gmail.com

²Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM, CEI UAM+CSIC), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España.

Palabras clave: hidrólisis enzimática, ORAC-FL, pajuro

Introducción. Las proteínas vegetales, hoy en día se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional sino como insumos para la obtención de compuestos bioactivos, que ejercen diversas actividades biológicas después de su liberación por hidrólisis enzimática o química. Un alimento andino que presenta un alto contenido de proteínas (hasta 25%) es el pajuro (*Erythrina edulis*), pudiendo servir de fuente para la obtención de péptidos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud.

Nuestro objetivo, fue obtener hidrolizados de proteínas de pajuro con propiedades antioxidantes mediante el uso de enzimas de distintos orígenes.

Metodología. Para obtener el concentrado proteico (CP) a partir de la harina de pajuro, se empleó el método reportado por Betancur et al. (1). La hidrólisis enzimática del CP se realizó con las enzimas comerciales: Alcalasa (0.3AU/g), Flavorzima (50 LAPU/g), y Neutrasa (0.8 AU/g) según las condiciones propuestas por Yust et al. (2), con algunas modificaciones. Los parámetros estudiados fueron el porcentaje de grado de hidrólisis (%GH) a los tiempos de 15, 30, 60 y 120 min evaluadas según el método reportado por Nielsen et al. (3) y la actividad antioxidante de los hidrolizados, determinada por el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno usando fluoresceína (ORAC-FL) (4). Se usó como estándar un análogo de la vitamina E (Trolox). Los productos de la hidrólisis se visualizaron mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE).

Resultados. Se muestran en las siguientes figuras.

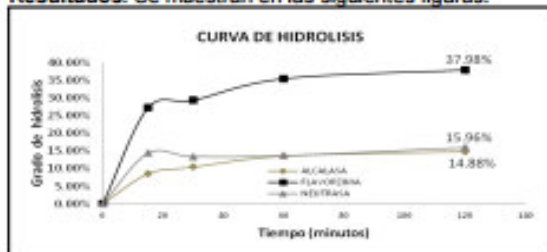


Fig. 1. Curvas de hidrólisis del concentrado proteico de pajuro (*Erythrina edulis*) con: Alcalasa, Flavorzima y Neutrasa a 50°C

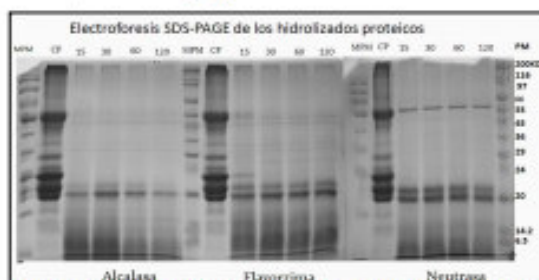


Fig. 2. Perfiles de los hidrolizados proteicos en SDS-PAGE a distintos tiempos (min) de hidrólisis.

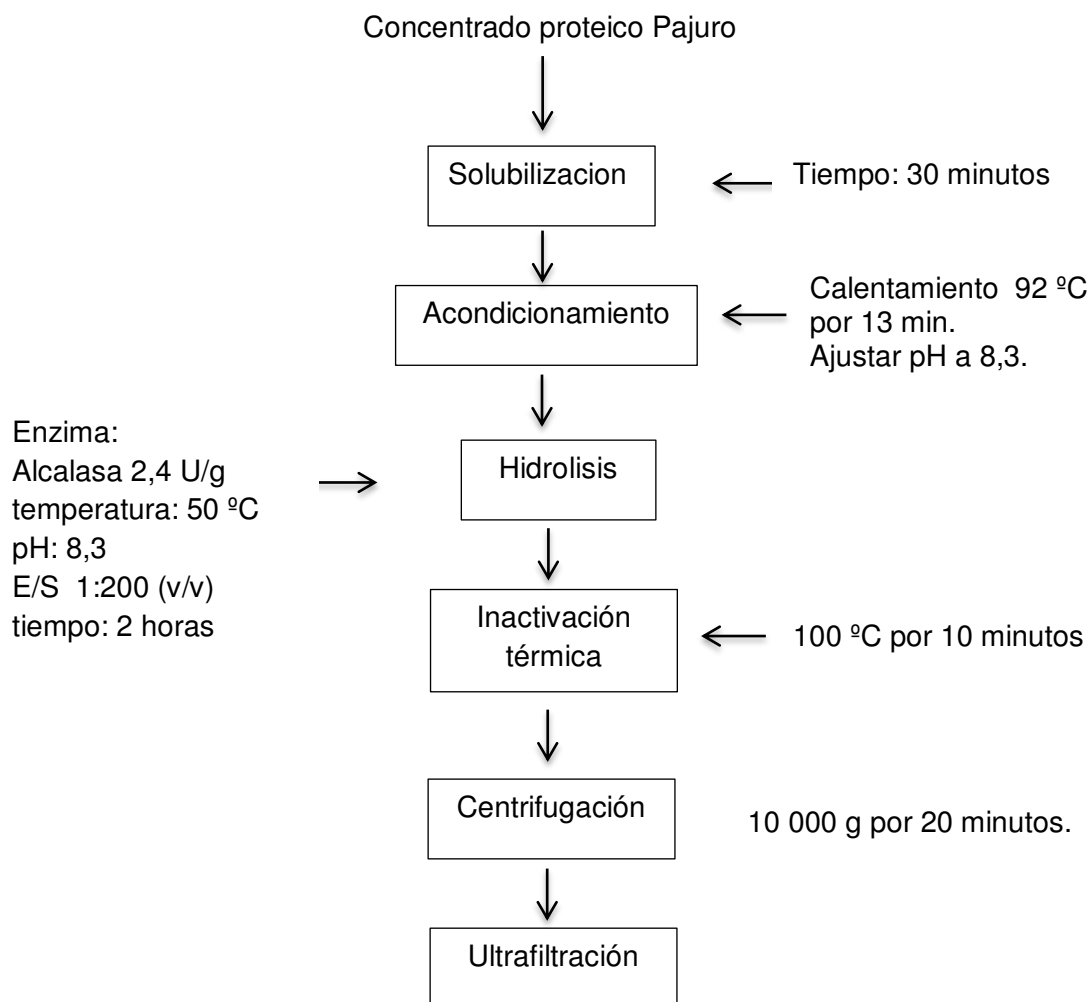
El análisis electroforético del CP del pajuro muestra bandas proteicas de aproximadamente 55, 36, 29 y de 20-24kDa predominantemente, las cuales tras la hidrólisis enzimática disminuyen significativamente aumentando las bandas correspondientes a los péptidos de bajo peso molecular. La actividad antioxidante de los hidrolizados (valor ORAC-FL) fueron 27.63, 13.34 y 11.97 μ M de equivalente de Trolox (ET) /mg de proteína del hidrolizado usando Alcalasa, Flavorzima y Neutrasa, respectivamente.

Conclusiones. La hidrólisis enzimática de proteínas de pajuro se muestra como una estrategia de obtención de péptidos con propiedades antioxidantes. La mayor actividad antioxidante fue obtenida en los hidrolizados obtenidos con Alcalasa 27.63 μ M ET /mg de proteína.

Agradecimiento. Al financiamiento por parte del proyecto FINCYT "Obtención y caracterización de péptidos con actividad antimicrobiana y antioxidante a partir de semillas de *Erythrina edulis*" Contrato N°186-FINCYT-13-PIA.

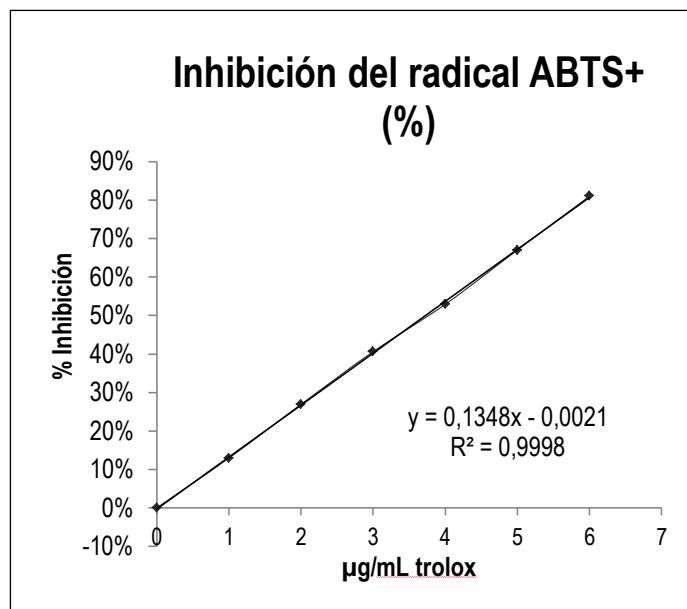
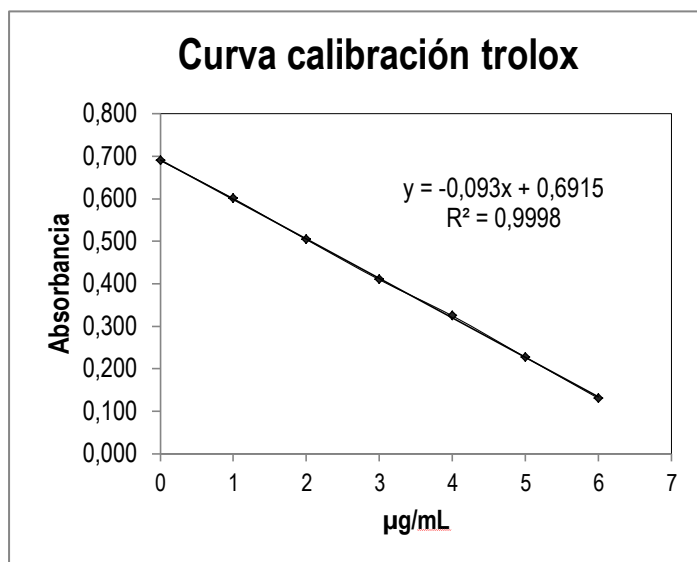
Referencias bibliográficas

1. Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Chel-Guerrero, L. Wet (2004). Journal of the Science of Food and Agriculture 84(10):1193-1201.
2. Yust M.; Pedroche, J.; Girón, J. Alaiñz, M.; Millán, F.; Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase Food Chemistry. 81:363-369
3. Nielsen P, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci 2001; 66:642
4. Álvarez, R., Carvalho, C., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., Londoño, J. (2011). Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 774-781

ANEXO N°4**Hidrolisis enzimatica del concentrado proteico de Pajuro**

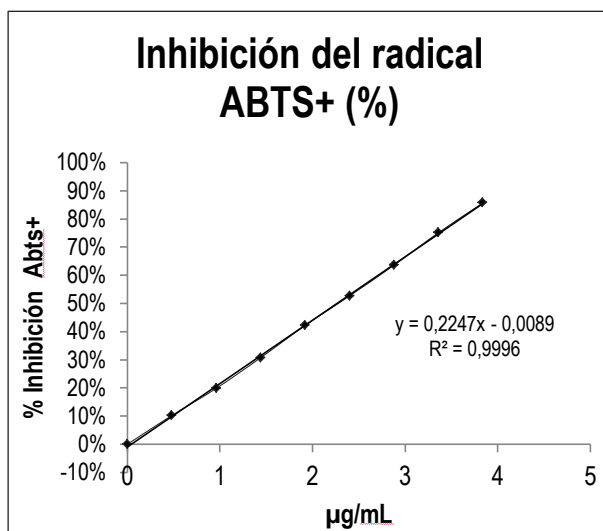
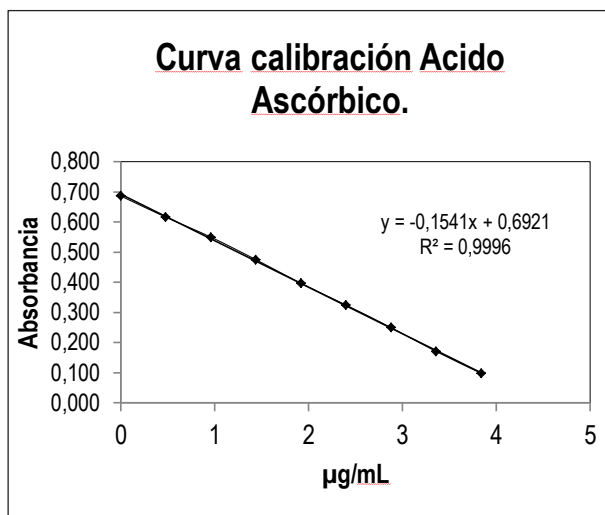
ANEXO N° 5

Curva calibración con Trolox para determinar actividad antioxidante ABTS.



ANEXO N°6

Curva de calibración usando vitamina “c” como estándar, para la determinación de la actividad antioxidante.



ANEXO N°7

curva de calibración usando Trolox como estándar para la determinación de la actividad antioxidante ORAC.

